

Bruxelles, 14. rujna 2016.  
(OR. en)

12209/16  
ADD 3

COMPET 482  
ENV 583  
CHIMIE 47  
MI 574  
ENT 168  
SAN 324  
CONSOM 212

#### POP RATNA BILJEŠKA

---

Od: Europska komisija

Datum primitka: 5. rujna 2016.

Za: Glavno tajništvo Vijeća

---

Predmet: UREDBA KOMISIJE (EU) .../... od XXX o izmjeni Priloga Uredbi (EZ) br. 440/2008 o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) radi prilagodbe tehničkom napretku

---

Za delegacije se u prilogu nalazi dokument D045907/02.

---

Priloženo: D045907/02

## C.49. Ispitivanje akutne toksičnosti na ribljim embrijima

### UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 236 (2013.). Njome se opisuje ispitivanje akutne toksičnosti na embrijima zebrica (*Danio rerio*). Ispitivanje je namijenjeno za određivanje akutne toksičnosti kemikalija na ribama u embrionalnom stadiju. Ono se temelji na studijama i provjerama provedenima na zebricama (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12., 13., 14.). Uspješno se primjenjuje na niz kemikalija različitih načina djelovanja te različite topljivosti, hlapljivosti i hidrofobnosti (ispitano u 15. i 16.).
2. Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

### NAČELO ISPITIVANJA

3. Netom oplodena jajašca zebrica izlažu se ispitivanoj kemikaliji 96 sati. Svaka 24 sata bilježe se do četiri apikalna zapažanja kao pokazatelji smrtonosnog djelovanja (6.): i. koagulacija oplodjenih jajašaca, ii. izostanak formiranja somita, iii. neodvajanje korijena repa od žumanjčane vrećice i iv. izostanak otkucaja srca. Na kraju razdoblja izlaganja utvrđuje se akutna toksičnost na temelju pozitivnog ishoda bilo kojega od četiri apikalna zapažanja te se izračunava  $LC_{50}$  (srednja smrtonosna koncentracija).

### POČETNA RAZMATRANJA

4. Korisne informacije o specifičnim svojstvima tvari uključuju strukturnu formulu, molekularnu masu, čistoću, stabilnost u vodi i na svjetlosti,  $pK_a$  i  $K_{ow}$ , topljivost u vodi, tlak pare i rezultate ispitivanja lake biorazgradivosti (ispitna metoda C.4. (17.) ili ispitna metoda C.29. (18.)). Topljivost i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, na temelju koje se može zaključiti mogu li se očekivati gubitci zbog isparavanja ispitivane kemikalije. Potrebna je pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju tvari u ispitnim otopinama s utvrđenom i dokumentiranom točnošću i granicom otkrivanja.
5. Ako se ispitna metoda primjenjuje za ispitivanje smjese, potrebno je što više informacija o sastavu smjese, npr. o kemijskom identitetu njezinih sastojaka, njihovoj količinskoj zastupljenosti i specifičnim svojstvima (vidjeti stavak 4.). Prije primjene ispitne metode za regulatorno ispitivanje smjese trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu.

6. Kad je riječ o tvarima koje se mogu aktivirati u metabolizmu, postoje dokazi da embriji zebrića imaju sposobnost biotransformacije (19., 20., 21., 22.). Međutim, metaboličke sposobnosti riba u embrionalnom stadiju ne odgovaraju uvijek onima mladih ili odraslih riba. Primjerice, u ispitivanju akutne toksičnosti na ribljim embrijima za protoksičnu tvar alil-alkohol nije utvrđeno da je toksična (9.). Stoga se, ako postoje ikakve naznake da bi metaboliti ili drugi značajni produkti transformacije mogli biti toksičniji od matičnog sastojka, preporučuje provesti ispitivanje i s tim metabolitima / produktima transformacije te uključiti i te rezultate pri zaključivanju o toksičnosti ispitivane kemikalije, ili provesti još jedno ispitivanje u kojemu se pomnije razmatra metabolizam.
7. Za tvari molekularne mase  $\geq 3$  kDa, tvari vrlo krupne molekularne strukture i tvari koje uzrokuju odgođeno valjenje, čime bi se moglo onemogućiti ili smanjiti izlaganje nakon valjenja, zbog ograničene bioraspoloživosti tih tvari očekuje se neosjetljivost embrija, pa bi druga ispitivanja toksičnosti mogla biti prikladnija.

## VALJANOST ISPITIVANJA

8. Za valjanost rezultata ispitivanja primjenjuju se sljedeći kriteriji:
- a) od prikupljenih jajašaca u ispitnoj šarži trebalo bi biti oplođeno  $\geq 70$  %;
  - b) temperatura vode u ispitnim komorama trebala bi se održavati na  $26 \pm 1$  °C tijekom cijelog ispitivanja;
  - c) u negativnoj kontroli (s vodom za razrjeđivanje) te, prema potrebi, u kontroli s otapalom trebalo bi preživjeti ukupno  $\geq 90$  % embrija u 96 sati izlaganja;
  - d) izlaganje pozitivnoj kontroli (npr. 4,0 mg/l 3,4-dikloroanilina za zebriće) trebalo bi rezultirati smrtnošću od najmanje 30 % nakon 96 sati izlaganja;
  - e) stopa valjenja u negativnoj kontroli (i, prema potrebi, kontroli s otapalom) trebala bi biti  $\geq 80$  % nakon 96 sati izlaganja;
  - f) nakon 96 sati izlaganja koncentracija otopljenog kisika u negativnoj kontroli i najviša ispitna koncentracija trebale bi biti zasićenosti  $\geq 80$  %.

## OPIS METODE

9. U Dodatku 2. je pregled preporučenih uvjeta držanja i ispitivanja.

### Oprema

10. Potrebna je sljedeća oprema:

- a) akvariji od kemijski inertnog materijala (npr. stakla) i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučenu količinu punjenja (vidjeti „Držanje uzgojnih riba”, stavak 14.);
- b) invertni mikroskop i/ili binokularni mikroskop s povećanjem od barem 80 puta. Ako se temperatura prostorije u kojoj se bilježe zapažanja ne može prilagoditi na  $26 \pm 1$  °C, treba upotrijebiti pokretni stolić mikroskopa s kontrolom temperature ili druge metode za održavanje potrebne temperature;
- c) ispitne komore; npr. standardne ploče s 24 bunarića dubine oko 20 mm (vidjeti „Ispitne komore”, stavak 11.);
- d) sredstvo kao što je samoljepljiva folija za pokrivanje ploča s 24 bunarića;
- e) inkubator ili prostorija s kontroliranom temperaturom kako bi se u bunarićima (ili u ispitnim komorama) mogla održati temperatura od  $26 \pm 1$  °C;
- f) mjerač pH-vrijednosti;
- g) mjerač kisika;
- h) oprema za određivanje tvrdoće vode i vodljivosti;
- i) ladica za mrijest: pladnjevi od stakla, nehrđajućeg čelika ili nekog drugog inertnog materijala; žičana mrežica (veličine oka  $2 \pm 0,5$  mm) od nehrđajućeg čelika ili drugog inertnog materijala za zaštitu položenih jajašaca; supstrat za mriješćenje (npr. umjetne biljke od inertnog materijala) (ispitna metoda C.48., Dodatak 4.a (23.));
- j) pipete s proširenim otvorima za sakupljanje jajašaca;
- k) staklene posude za pripremu različitih ispitnih koncentracija i vode za razrjeđivanje (čaše, graduirane tikvice, graduirani cilindri i graduirane pipete) ili za prikupljanje jajašaca zebrića (npr. laboratorijske čaše, zdjelice za kristalizaciju);
- l) ako se u ispitivanju primjenjuju alternativni sustavi izlaganja, kao što su protočno ispitivanje (24.) ili pasivno doziranje (25.), potrebni su odgovarajući prostori i oprema.

### Ispitne komore

11. Trebalo bi upotrebljavati staklene ili polistirenske ispitne komore (npr. ploče s 24 bunarića, od kojih svaki ima kapacitet punjenja 2,5 – 5 ml). Ako se sumnja na adsorpciju na polistiren (npr. za nepolarne, planarne tvare s visokim  $K_{OW}$ ), trebalo bi upotrijebiti

inertne materijale (staklo) kako bi se smanjili gubici zbog adsorpcije (26.). Ispitne komore trebale bi biti nasumično raspoređene u inkubatoru.

### Voda i ispitni uvjeti

12. Preporučuje se da se voda za držanje razrijedi tako da se postignu razine tvrdoće koje su tipične za niz različitih površinskih voda. Vodu za razrjeđivanje treba pripremiti od rekonstituirane vode (27.). Dobiveni stupanj tvrdoće trebao bi biti jednak 100 – 300 mg/l  $\text{CaCO}_3$  kako bi se spriječilo prekomjerno taloženje kalcijeva karbonata. Mogu se upotrebljavati i druge površinske vode i izvorske vode dobro poznatih svojstava. Rekonstituirana voda može se prilagoditi vodi za držanje male tvrdoće razrjeđivanjem deioniziranom vodom u omjeru 1 : 5 do minimalne tvrdoće od 30 – 35 mg/l  $\text{CaCO}_3$ . Voda se prozračuje do zasićenja kisikom prije dodavanja ispitivane kemikalije. Temperaturu u bunarićima trebalo bi održavati na  $26 \pm 1$  °C tijekom cijelog ispitivanja. pH-vrijednost trebala bi biti između 6,5 i 8,5 te tijekom ispitivanja ne bi smjela varirati unutar tog raspona za više od 1,5 jedinica. Ako se očekuje da pH-vrijednost neće ostati unutar tog raspona, trebalo bi je podesiti prije početka ispitivanja. Podešavanje pH trebalo bi izvesti tako da ne dođe do znatne promjene koncentracije matične otopine i da se ne izazove kemijska reakcija ili taloženje ispitivane kemikalije. Za podešavanje pH u otopinama koje sadržavaju ispitivanu kemikaliju preporučuje se upotrijebiti klorovodik (HCl) i natrijev hidroksid (NaOH).

### Ispitne otopine

13. Ispitne otopine u određenim koncentracijama mogu se pripremiti npr. razrjeđivanjem matične otopine. Matične otopine trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Ako se ispitivana kemikalija teško otapa u vodi, trebalo bi primijeniti postupke opisane u OECD-ovim Smjernicama br. 23 za postupanje s analitički zahtjevnim tvarima i smjesama (28.). Trebalo bi izbjegavati upotrebu otapala, iako će ona u nekim slučajevima možda biti potrebna kako bi se dobila matična otopina odgovarajuće koncentracije. Ako se u pripremi matične otopine upotrebljava otapalo, njegova konačna koncentracija ne bi smjela biti viša od 100  $\mu\text{l/l}$  i trebala bi biti jednaka u svim ispitnim posudama. Ako se upotrebljava otapalo, potrebna je dodatna kontrola s otapalom.

### Držanje uzgojnih riba

14. Za proizvodnju jajašaca uzimaju se uzgojne neizlagane zebrice divljeg tipa s dobro dokumentiranom stopom oplodnje jajašaca. Ribe ne bi smjele imati makroskopski vidljive simptome infekcije ili bolesti niti biti podvrgnute ikakvom farmaceutskom tretmanu

(akutnom ili profilaktičkom) tijekom dva mjeseca prije mriješćenja. Uzgojne ribe drže se u akvariju s preporučenim kapacitetom punjenja od 1 l vode po ribi i fiksnim fotoperiodom od 12 – 16 sati (29., 30., 31., 32., 33). Optimalnu jačinu filtriranja trebalo bi podesiti; prejako filtriranje koje uzrokuje veliko strujanje vode trebalo bi izbjegavati. Za hranjenje vidjeti Dodatak 2. Suvišno hranjenje treba izbjegavati, a kvalitetu vode i čistoću akvarija potrebno je redovito nadzirati i prema potrebi vraćati na početno stanje.

### Ispitivanje osposobljenosti

15. Kao referentnu kemikaliju trebalo bi ispitati, po mogućnosti dva puta godišnje, 3,4-dikloroanilin (upotrijebljen u validacijskim studijama u 1. i 2.) u punom rasponu koncentracija-odgovora kako bi se provjerila osjetljivost soja ribe koji se upotrebljava. Svaki laboratorij koji tek počinje primjenjivati ovo ispitivanje trebao bi upotrijebiti referentnu kemikaliju. Laboratoriji mogu upotrijebiti tu kemikaliju da dokažu svoju tehničku osposobljenost za provedbu ispitivanja prije dostavljanja podataka u regulatorne svrhe.

### Dobivanje jajašaca

16. Jajašca zebrica mogu se dobiti iz skupina za mriješćenje (u posebnim akvarijima za mriješćenje) ili masovnim mriješćenjem (u akvarijima za držanje). U slučaju skupina za mriješćenje mužjaci i ženke (npr. u omjeru 2 : 1) uzgojne skupine stavljaju se u akvarije za mriješćenje nekoliko sati prije mraka na dan prije ispitivanja. Budući da u skupinama za mriješćenje zebrica mriješćenje povremeno može izostati, preporučuje se paralelno upotrebljavati najmanje tri akvarija za mriješćenje. Kako bi se izbjegla genetička pristranost, jajašca se sakupljaju iz najmanje tri uzgojne skupine, miješaju i nasumično odabiru.
17. Za sakupljanje jajašaca, ladice za mrijest stavljaju se u akvarije za mriješćenje ili akvarije za držanje prije mraka na dan prije ispitivanja ili prije svitanja na dan ispitivanja. Kako bi se spriječilo da odrasle zebriće pojedju jajašca, ladice za mrijest pokrivaju se inertnom žičanom mrežicom odgovarajuće veličine oka (otprilike  $2 \pm 0,5$  mm). Ako se to smatra potrebnim, na mrežicu se mogu pričvrstiti umjetne biljke od inertnog materijala (npr. plastika ili staklo) kao podražaj za mriješćenje (3., 4., 5., 23., 35.). Trebalo bi upotrebljavati iskušane plastične materijale koji ne otpuštaju svoje sastojke u vodu (npr. ftalati). Parenje, mriješćenje i oplodnja odvijaju se u 30 minuta nakon svitanja i ladice za mrijest s prikupljenim jajašcima mogu se pažljivo izvaditi. Nakon sakupljanja jajašaca iz ladica za mrijest preporučuje se isprati ih rekonstituiranom vodom.

### Razlikovanje jajašaca

18. Na 26 °C nakon otprilike 15 minuta dolazi do prvog brazdanja oplođenih jajašaca, a daljnjim istovremenim brazdanjima nastaju 4, 8, 16 i 32 stanice – blastomere (vidjeti Dodatak 3.) (35.). U tim fazama oplođena jajašca mogu se lako prepoznati po razvoju blastule.

## POSTUPAK

### Uvjeti izlaganja

19. Dvadeset embrija po koncentraciji (jedan embrij po bunariću) izlaže se ispitivanoj kemikaliji. Izlaganje bi trebalo biti takvo da se  $\pm 20\%$  nazivne koncentracije kemikalije zadrži tijekom cijelog ispitivanja. Ako to nije moguće u statičkom sustavu, trebalo bi primijeniti prikladna razdoblja obnavljanja za polustatičko ispitivanje (npr. obnavljanje svaka 24 sata). U tom slučaju koncentracije izlaganja treba provjeriti barem u najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji na početku i na kraju svakog razdoblja izlaganja (vidjeti stavak 36.). Ako se koncentracija izlaganja od  $\pm 20\%$  nazivne koncentracije ne može održati, sve koncentracije treba mjeriti na početku i na kraju svakog razdoblja izlaganja (vidjeti stavak 36.). Pri obnavljanju ispitne otopine treba paziti da embriji ostanu prekriveni malom količinom stare ispitne otopine kako bi se izbjeglo njihovo sušenje. Plan ispitivanja može se prilagoditi kako bi se ispunili zahtjevi za ispitivanje određenih tvari (npr. protočno (24.) ili pasivno doziranje (25.) za lako razgradive ili jako adsorptivne tvari (29.), ili drugo za hlapljive tvari (36., 37.)). U svakom slučaju treba paziti da stres za embrije bude što manji. Ispitne komore trebalo bi kondicionirati s ispitnim otopinama najmanje 24 sata prije početka ispitivanja. Ispitni uvjeti sažeto su opisani u Dodatku 2.

### Ispitne koncentracije

20. Obično je potrebno pet koncentracija ispitivane kemikalije koje se razlikuju za stalni faktor od najviše 2,2 da se zadovolje statistički zahtjevi. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Najviša ispitna koncentracija trebala bi, po mogućnosti, izazvati smrtnost od 100 %, a najniža ispitna koncentracija ne bi trebala imati vidljive učinke, kako je opisano u stavku 28. Ispitivanjem za utvrđivanje raspona prije glavnog ispitivanja omogućuje se odabir odgovarajućeg raspona koncentracija. Ispitivanje za utvrđivanje raspona obično se provodi s deset embrija po koncentraciji. Sljedeće upute odnose se na ispitivanje s pločama s 24 bunarića. Ako se upotrebljavaju drugačije ispitne komore (npr. male Petrijeve zdjelice) ili se ispituje više koncentracija, upute se moraju na odgovarajući način prilagoditi.
21. Pojednosti i vizualne upute za raspodjelu koncentracija u pločama s 24 bunarića dostupne su u stavku 27. i u Dodatku 4. slici 1.

## Kontrole

22. Kontrole s vodom za razrjeđivanje potrebne su i kao negativna kontrola i kao kontrola unutar ploče. Ako se primijeti više od jednog mrtvog embrija u kontroli unutar ploče, ploča se odbacuje, čime se smanjuje broj koncentracija za izračunavanje LC<sub>50</sub>. Ako se cijela ploča odbaci, može biti teže procijeniti i razlikovati vidljive učinke, posebno ako je odbačena ploča kontrola s otapalom ili ploča s tretiranim embrijima. U prvom slučaju ispitivanje se mora ponoviti. U drugom slučaju gubitak cijele tretirane skupine / tretiranih skupina zbog smrtnosti u unutarnjoj kontroli može za posljedicu imati smanjivanje mogućnosti procjene učinaka i određivanja vrijednosti LC<sub>50</sub>.
23. Za svaku šaržu jajašaca koja se upotrebljava za ispitivanje provodi se pozitivna kontrola s fiksnom koncentracijom od 4 mg/l 3,4-dikloroanilina.
24. Ako se upotrebljava otapalo, dodatna skupina od 20 embrija izlaže se otapalu u zasebnoj ploči s 24 bunarića te tako služi kao kontrola s otapalom. Kako bi se ispitivanje smatralo prihvatljivim, trebalo bi dokazati da otapalo nema značajne učinke na vrijeme potrebno za valjenje ni na preživljavanje niti ima bilo kakve druge štetne učinke na embrije (usp. stavak 8. točku (c)).

## Početak izlaganja i trajanje ispitivanja

25. Ispitivanje treba započeti što je prije moguće nakon oplodnje jajašaca i završiti nakon 96 sati izlaganja. Embriji bi trebali biti uronjeni u ispitne otopine prije nego što započne brazdanje blastodiska ili, najkasnije, do faze sa 16 stanica. Kako bi se započelo s izlaganjem što je prije moguće, najmanje dvostruki broj jajašaca potreban po skupini predviđenoj za tretiranje nasumično se odabire i prenosi u odgovarajuće koncentracije i kontrole (npr. u zdjelice za kristalizaciju od 100 ml; jajašca bi trebala biti potpuno prekrivena) najkasnije 90 minuta nakon oplodnje.
26. Iskoristiva oplođena jajašca treba u roku od 180 minuta nakon oplodnje odvojiti od neoplođenih i prenijeti u ploče s 24 bunarića koje su prethodno kondicionirane 24 sata i zatim ponovno napunjene s 2 ml svježe pripremljene ispitne otopine po bunariću. S pomoću stereomikroskopa (po mogućnosti povećanja  $\geq 30$  puta) odabiru se oplođena jajašca koja se brazdaju i pritom ne pokazuju očite nepravilnosti (npr. asimetrija, nastanak vezikula) ili ozljede koriona. Za sakupljanje i odvajanje jajašaca vidjeti Dodatak 3. slike 1. i 3. te Dodatak 4. sliku 2.

## Raspodjela jajašaca u ploče s 24 bunarića

27. Jajašca se raspodjeljuju u ploče s bunarićima kako slijedi (vidjeti također Dodatak 4. sliku 1.):



- 20 jajašaca u jednu ploču za svaku ispitnu koncentraciju,
- 20 jajašaca u jednu ploču kao kontrola s otapalom (ako je potrebno),
- 20 jajašaca u jednu ploču kao pozitivna kontrola,
- 4 jajašca u svaku od navedenih ploča u vodu za razrjeđivanje kao kontrola unutar ploče,
- 24 jajašca u jednu pločicu u vodu za razrjeđivanje kao negativna kontrola.

## Zapažanja

28. Apikalna zapažanja koja se provode za svaki ispitni embrij jesu sljedeća: koagulacija embrija, izostanak formiranja somita, neodvajanje repa i izostanak otkucaja srca (tablica 1.). Na temelju tih zapažanja utvrđuje se smrtnost: svaki pozitivan ishod u jednome od tih zapažanja znači da je embrij zebrice mrtav. Usto, svakodnevno se bilježi valjenje u tretiranim i kontrolnim skupinama, s početkom nakon 48 sati. Zapažanja se bilježe svaka 24 sata do kraja ispitivanja.

**Tablica 1.** Apikalna zapažanja akutne toksičnosti u embrija zebrica 24 sata – 96 sati nakon oplodnje.

	Vrijeme izlaganja			
	24 sata	48 sati	72 sata	96 sati
Koagulacija embrija	+	+	+	+
Izostanak formiranja somita	+	+	+	+
Neodvajanje repa	+	+	+	+
Izostanak otkucaja srca		+	+	+

29. *Koagulacija embrija:* Koagulirani su embriji mliječno bijele boje, a pod mikroskopom izgledaju tamni (vidjeti Dodatak 5. sliku 1.). Broj koaguliranih embrija određuje se nakon 24, 48, 72 i 96 sati.
30. *Izostanak formiranja somita:* Pri temperaturi od  $26 \pm 1$  °C nakon 24 sata u embrija zebrice koji se normalno razvija formirano je 20-ak somita (vidjeti Dodatak 5. sliku 2.). U embrija koji se normalno razvija uočljivi su spontani pokreti (s jedne na drugu stranu). Spontani pokreti upućuju na formiranje somita. Nepostojanje somita bilježi se nakon 24, 48, 72 i 96 sati. Ako se somiti ne formiraju nakon 24 sata, to može biti znak općeg zastoja u razvoju. Najkasnije nakon 48 sati somiti bi trebali biti razvijeni. U protivnom se zameci smatraju mrtvima.
31. *Neodvajanje repa:* U embrija zebrice koji se normalno razvija odvajanje repa (vidjeti Dodatak 5. sliku 3.) od žumanjčane vrećice zamjećuje se nakon produljenja stražnjeg dijela embrionalnog tijela. Neodvajanje repa bilježi se nakon 24, 48, 72 i 96 sati.

32. *Izostanak otkucaja srca*: U embrija zebriće koji se normalno razvija pri temperaturi od  $26 \pm 1$  °C otkucaji srca zamjećuju se nakon 48 sati (vidjeti Dodatak 5. sliku 4.). Bilježenje ove krajnje točke trebalo bi provoditi posebno pažljivo jer nepravilne otkucaje srca *ne* bi trebalo bilježiti kao smrtonosne. Nadalje, vidljivi otkucaji srca bez cirkulacije u trbušnoj aorti (*aorta abdominalis*) ne smatraju se smrtonosnima. Pri bilježenju ove krajnje točke embrije u kojih nisu vidljivi otkucaji srca trebalo bi promatrati pod povećanjem od najmanje 80 puta najmanje jednu minutu. Izostanak otkucaja srca bilježi se nakon 48, 72 i 96 sati.
33. Stope valjenja svih tretiranih i kontrolnih skupina trebalo bi bilježiti od 48 sati nadalje i uvrstiti u izvješća. Iako se valjenje ne primjenjuje kao krajnja točka za izračun LC<sub>50</sub>, njime se osigurava izloženost embrija bez potencijalne zaštitne funkcije koriona, što može pomoći u tumačenju podataka.
34. Dodaci 3. i 5. sadržavaju detaljan opis normalnog (35.) i primjere abnormalnog razvoja embrija zebriće.

### Analitička mjerenja

35. Na početku i na kraju ispitivanja mjere se pH, ukupna tvrdoća i vodljivost u kontroli/kontrolama i u najvišoj koncentraciji ispitivane kemikalije. U polustatičkim sustavima s obnavljanjem trebalo bi izmjeriti pH prije i nakon obnavljanja vode. Koncentracija otopljenog kisika mjeri se na kraju ispitivanja u negativnim kontrolama i u najvišoj ispitnoj koncentraciji s iskoristivim embrijima, gdje bi trebala biti u skladu s kriterijima valjanosti ispitivanja (vidjeti stavak 8. točku (f)). Ako postoji mogućnost da temperatura nije jednaka u svim pločama s 24 bunarića, ona se mjeri u tri nasumično odabrane posude. Temperaturu bi trebalo bilježiti po mogućnosti stalno za vrijeme ispitivanja, a barem jednom dnevno.
36. U statičkom sustavu koncentraciju ispitivane kemikalije trebalo bi mjeriti barem u najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji, a po mogućnosti u svim tretiranim skupinama, na početku i na kraju ispitivanja. U polustatičkom ispitivanju (s obnavljanjem), ako se očekuje da će koncentracija ispitivane kemikalije ostati u granicama od  $\pm 20$  % nazivnih vrijednosti, preporučuje se da se barem najviša i najniža ispitna koncentracija analiziraju odmah nakon pripreme te neposredno prije obnavljanja. U ispitivanju u kojem se predviđa da koncentracija ispitivane kemikalije neće ostati u granicama od  $\pm 20$  % nazivne vrijednosti moraju se analizirati sve ispitne koncentracije odmah nakon pripreme te neposredno prije obnavljanja. U slučaju nedostatne količine za analizu može biti korisno spojiti ispitne otopine ili upotrijebiti zamjenske komore koje su izrađene od istog materijala te imaju isti omjer volumena i površine kao ploče s 24 bunarića. Preporučuje se da se rezultati svakako temelje na izmjerenim koncentracijama. Ako koncentracije ne ostanu unutar 80 – 120 %

nazivne koncentracije, koncentracije koje imaju određeni učinak trebalo bi izraziti u odnosu na geometrijsku sredinu izmjerenih koncentracija; za više pojedinosti vidjeti 5. poglavlje Smjernica OECD-a za ispitivanje toksičnosti analitički zahtjevnih tvari i smjesa za vodene organizme (28.).

## ISPITIVANJE GRANIČNE KONCENTRACIJE

37. Uz primjenu postupaka opisanih u ovoj ispitnoj metodi može se provesti ispitivanje granične koncentracije pri koncentraciji od 100 mg/l ispitivane kemikalije ili pri granici topljivosti te kemikalije u ispitnom mediju (tj. pri nižoj od te dvije koncentracije) kako bi se dokazalo da je srednja smrtonosna koncentracija (LC<sub>50</sub>) viša od te koncentracije. Ispitivanje granične koncentracije trebalo bi provesti s po 20 embrija u tretiranoj skupini, pozitivnoj kontroli i, prema potrebi, kontroli s otapalom, te 24 embrija u negativnoj kontroli. Ako je smrtnost pri ispitivanoj koncentraciji za 10 % veća od smrtnosti u negativnoj kontroli (ili kontroli s otapalom), trebalo bi provesti cjelovitu studiju. Treba zabilježiti sve zamijećene učinke. Ako je smrtnost u negativnoj kontroli (ili kontroli s otapalom) veća od 10 %, ispitivanje nije valjano i treba ga ponoviti.

## PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

### Obrada rezultata

38. U ovom ispitivanju pojedinačni bunarići smatraju se neovisnim ponovljenim uzorcima za statističku analizu. Izrađuje se grafički prikaz postotka embrija za koje je nakon 48 i/ili 96 sati utvrđen pozitivan ishod najmanje jednog apikalnog zapažanja u odnosu na ispitne koncentracije. Za izračun nagiba krivulje, vrijednosti srednje smrtonosne koncentracije (LC<sub>50</sub>) i granica pouzdanosti (95 %) trebalo bi primijeniti odgovarajuće statističke metode (38.) te proučiti Smjernice OECD-a o aktualnim pristupima u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti (39.).

### Izvešće o ispitivanju

39. Izvešće o ispitivanju trebalo bi obuhvaćati sljedeće podatke:

#### *Ispitivana kemikalija:*

tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- podaci za kemijsku identifikaciju tvari, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća

prema potrebi i ako je praktički izvedivo itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi),

tvar s više sastojaka, tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal (UVCB tvar) ili smjesa:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizikalno-kemijska svojstva sastojaka.

*Ispitni organizmi:*

- znanstveni naziv, soj, podrijetlo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postupanje.

*Ispitni uvjeti:*

- ispitni postupak (npr. polustatičko ispitivanje s obnavljanjem),
- fotoperiod,
- plan ispitivanja (npr. broj ispitnih komora, vrste kontrole),
- obilježja kvalitete vode za držanje riba (npr. pH, tvrdoća, temperatura, vodljivost, otopljeni kisik),
- koncentracija otopljenog kisika, pH, ukupna tvrdoća, temperatura i vodljivost ispitnih otopina na početku i nakon 96 sati,
- način pripreme matičnih otopina i ispitnih otopina te učestalost obnavljanja,
- obrazloženje za upotrebu otapala i obrazloženje za odabir otapala (ako nije voda),
- nazivne ispitne koncentracije i rezultati svih analiza za određivanje koncentracije ispitivane kemikalije u ispitnim posudama; trebalo bi navesti i učinkovitost izdvajanja ispitivane tvari pri primjeni metode te granicu kvantifikacije (LoQ),
- dokaz da kontrole ispunjavaju opće kriterije valjanosti za preživljavanje,
- stopa oplodnje jajašaca,
- stopa valjenja u tretiranim i kontrolnim skupinama.

*Rezultati:*

- najviša koncentracija koja ne izaziva smrtnost u razdoblju ispitivanja,
- najniža koncentracija koja izaziva 100 %-tnu smrtnost u razdoblju ispitivanja,
- ukupna smrtnost u svakoj koncentraciji u svakom preporučenom vremenu promatranja,
- vrijednosti LC<sub>50</sub> nakon 96 sati (i eventualno nakon 48 sati) za smrtnost s granicama pouzdanosti od 95 %, ako je to moguće,
- graf krivulje za odnos koncentracija i smrtnosti na kraju ispitivanja,
- smrtnost u kontrolama (negativne kontrole, kontrole unutar ploče, pozitivne kontrole i

- sve upotrijebljene kontrole s otapalom),
- podaci o ishodima svakog od četiri apikalna zapažanja,
  - pojava i opis morfoloških i fizioloških anomalija, ako ih ima (vidjeti primjere navedene u Dodatku 5. slici 2.),
  - svi događaji tijekom ispitivanja koji su možda utjecali na rezultate,
  - statistička analiza i obrada podataka (probit analiza, logistički regresijski model i geometrijska sredina za  $LC_{50}$ ),
  - nagib i granice pouzdanosti regresije (transformirane) krivulje koncentracija-odgovor.

*Sva odstupanja od ispitne metode i odgovarajuća objašnjenja.*

*Diskusija i tumačenje rezultata.*

## LITERATURA

1. OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.
2. OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.
3. Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC<sub>50</sub> test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.
4. ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
5. Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) - a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
6. Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test - preliminary results. ATLA 22, 12-19.
7. Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Doktorski rad, Tehničko sveučilište u Dresdenu, Njemačka.
8. Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.
9. Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

10. Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51: 97-102.
11. Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. *Toxicol. In Vitro* 8: 401-406.
12. Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 878-882.
13. Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryol- larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 16: 566-571.
14. Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3024-3031.
15. Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 1768-1783.
16. Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*: 149 (2), 196-209.
17. Poglavlje C.4. ovog Priloga: Laka biorazgradivost.
18. Poglavlje C.29. ovog Priloga: Laka biorazgradivost – CO<sub>2</sub> u začepljenim posudama.
19. Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25-36.
20. Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
21. Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl

- hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242-249.
22. Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244-252.
  23. Poglavlje C.48. ovog Priloga: Kratkoročni reprodukcijski test na ribama. Vidjeti Dodatak 4.a.
  24. Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. in vitro* 23: 1436-1442.
  25. Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097-4102.
  26. Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1676-1682.
  27. ISO (1996) International Standards. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Dostupno na: [<http://www.iso.org>].
  28. OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
  29. Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121-173.
  30. Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5<sup>th</sup> edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
  31. Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>.



32. Europska komisija (2007.): Preporuka Komisije 2007/526/EZ od 18. lipnja 2007. o smjernicama za smještaj životinja kojima se koristi za pokusne i druge znanstvene svrhe te skrb o njima (priopćena pod brojem dokumenta C(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF>].
33. Europska unija (2010.): Direktiva 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2010. o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. *Službeni list Europske unije*, L 276: 33. – 79.; 20.10.2010. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF>.
34. Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *J. Appl. Ichthyol.* 2: 173-181.
35. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
36. Poglavlje C.2. ovog Priloga: Test akutne imobilizacije *Daphnia sp.*
37. Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1970-1978.
38. ISO (2006) International Standard. Water quality - Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Dostupno na: [<http://www.iso.org>].
39. OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.
40. Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detaljni pregled "Fish embryo toxicity assays". Izvješće pod ugovorom br. 20385422 njemačke Savezne agencije za okoliš (UBA), Berlin, str. 298.

## Dodatak 1.

### DEFINICIJE

**Apikalna krajnja točka:** uzrokuje učinke na razini populacije.

**Blastula:** stanična formacija oko animalnog pola koja obuhvaća određeni dio žumanjka.

**Kemikalija:** tvar ili smjesa.

**Epibolija:** veliko umnožavanje pretežno epidermalnih stanica u fazi gastrulacije embrija i njihovo premještanje s dorzalne na ventralnu stranu, čime se entodermalni slojevi stanica uvlače u procesu sličnom invaginaciji i žumanjak se ugrađuje u embrij.

**Protočno ispitivanje:** test sa stalnim protokom ispitne otopine kroz ispitni sustav za vrijeme izlaganja.

**Kontrola unutar ploče:** unutarnja kontrola koja se sastoji od 4 bunarića napunjena vodom za razrjeđivanje po ploči s 24 bunarića radi utvrđivanja moguće kontaminacije ploča koju prouzroči proizvođač ili istraživač tijekom postupka i svih učinaka na ploču koji mogu utjecati na rezultat ispitivanja (npr. promjena temperature).

**IUPAC:** Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju

**Voda za držanje:** voda u kojoj se drže odrasle ribe.

**Medijan smrtonosne koncentracije (LC<sub>50</sub>):** koncentracija ispitivane kemikalije koja je procijenjena kao smrtonosna za 50 % ispitnih organizama za vrijeme ispitivanja.

**Polustatičko ispitivanje s obnavljanjem:** ispitivanje s redovitim obnavljanjem ispitne otopine nakon određenih razdoblja (npr. svaka 24 sata).

**SMILES:** Simplified Molecular Input Line Entry Specification

**Somit:** u embriju kralježnjaka koji se razvija somiti su nakupine mezoderma raspoređene na lateralnom dijelu neuralne cijevi iz kojih se s vremenom razvijaju dermis (dermatom), skeletni mišići (miotom) i kralješci (sklerotom).

**Statičko ispitivanje:** ispitivanje u kojem ispitne otopine ostaju nepromijenjene tijekom cijelog ispitivanja.

**Ispitivana kemikalija:** bilo koja tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

**UVCB:** tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

## Dodatak 2.

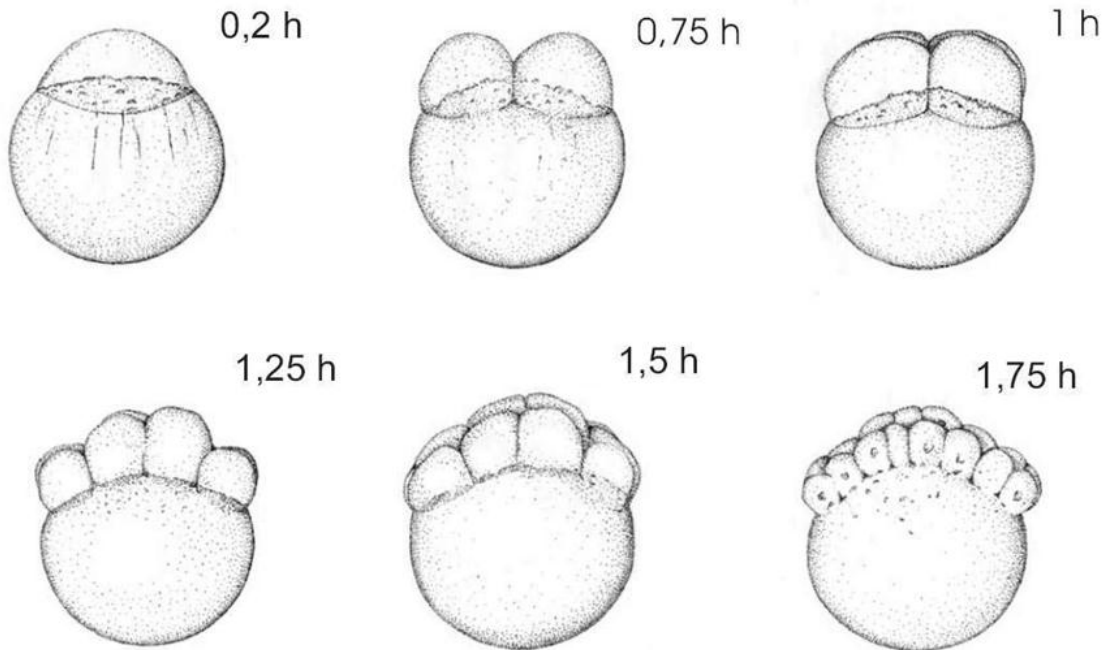
### DRŽANJE, UZGOJ I TIPIČNI UVJETI ZA ISPITIVANJA AKUTNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIJIMA ZEBRICA

<b><i>Zebrica (Danio rerio)</i></b>		
Podrijetlo vrste	Indija, Burma, Melaka, Sumatra	
Spolni dimorfizam	Ženke: izbočen trbuh kada nose jajašca Mužjaci: tanji, narančasta nijansa između plavih vodoravnih pruga (posebno očita na analnoj peraji)	
Hranjenje	Suha hrana u listićima (najviše 3 % težine ribe po danu) 3 – 5 puta dnevno; usto ličinke ( <i>nauplii</i> ) račića <i>Artemia</i> i/ili male vodenbuhe odgovarajuće veličine dobivene iz nekontaminiranih izvora. Živom se hranom bogati okoliš i stoga bi kad god je to moguće trebalo davati živu hranu. Kako bi se osigurala optimalna kvaliteta vode, trebalo bi ukloniti višak hrane i izmet otprilike jedan sat nakon hranjenja.	
Približna težina odraslih riba	Ženke: $0,65 \pm 0,13$ g Mužjaci: $0,5 \pm 0,1$ g	
Držanje uzgojnih riba	Osvjetljenje	Fluorescentne žarulje (širokog spektra); $10 - 20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 540 – 1080 lux, ili 50 – 100 ft-c (razine u laboratorijskim uvjetima); fotoperiod 12 – 16 sati
	Temperatura vode	$26 \pm 1$ °C
	Kvaliteta vode	Zasićenost $\text{O}_2 \geq 80$ %, tvrdoća: npr. $\sim 30 - 300$ mg/l $\text{CaCO}_3$ , $\text{NO}_3^-: \leq 48$ mg/l, $\text{NH}_4^+$ i $\text{NO}_2^-: < 0,001$ mg/l, rezidualni klor $< 10$ $\mu\text{g}/\text{l}$ , ukupni organski klor $< 25$ ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Dodatni kriteriji za kvalitetu vode	Čestice $< 20$ mg/l, ukupni organski ugljik $< 2$ mg/l, ukupni organofosforni pesticidi $< 50$ ng/l, ukupni organoklorini pesticidi plus poliklorirani bifenili $< 50$ ng/l
	Veličina akvarija za držanje	Npr. 180 l, 1 riba/l
	Pročišćavanje vode	Stalno (filtriranje ugljenom); druge mogućnosti uključuju kombinacije s polustatičkim sustavom s obnavljanjem ili protočnim sustavom s neprekidnim obnavljanjem vode
Preporučeni omjer mužjaka i ženki za razmnožavanje	2 : 1 (ili masovno mriješćenje)	
Akvariji za mriješćenje	Npr. akvariji od 4 l s dnom od čelične mreže i umjetnom biljkom kao podražajem za mriješćenje; vanjski grijači, ili masovno mriješćenje u akvarijima za držanje	
Struktura i izgled jajašaca	Stabilan korion (tj. vrlo proziran, neljepljiv, promjera $\sim 0,8 -$	

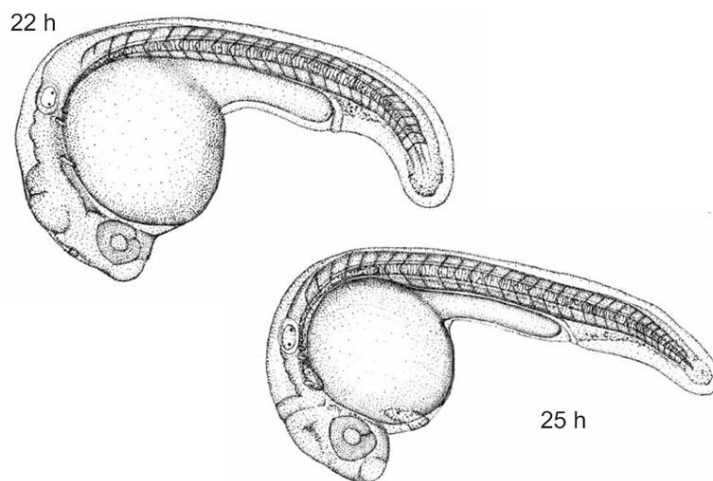
	1,5 mm)
Stopa mriješćenja	Jedna zrela ženka mrijesti najmanje 50 – 80 jajašaca dnevno. Ovisno o soju, stopa mriješćenja može biti znatno viša. Stopa oplodnje trebala bi biti $\geq 70\%$ . Za ribe koje se prvi put mrijeste stopa oplodnje jajašaca može biti niža u prvih nekoliko mriješćenja.
Vrsta ispitivanja	Statičko, polustatičko s obnavljanjem, protočno, $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ispitne komore kondicionirane 24 sata (npr. ploče s 24 bunarića po 2,5 – 5 ml)

### Dodatak 3.

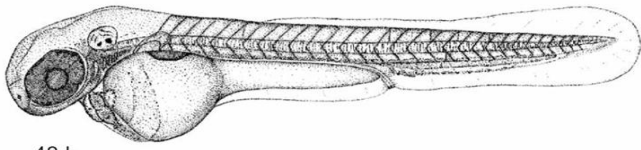
#### NORMALAN RAZVOJ ZEBRICE PRI TEMPERATURI OD 26°C



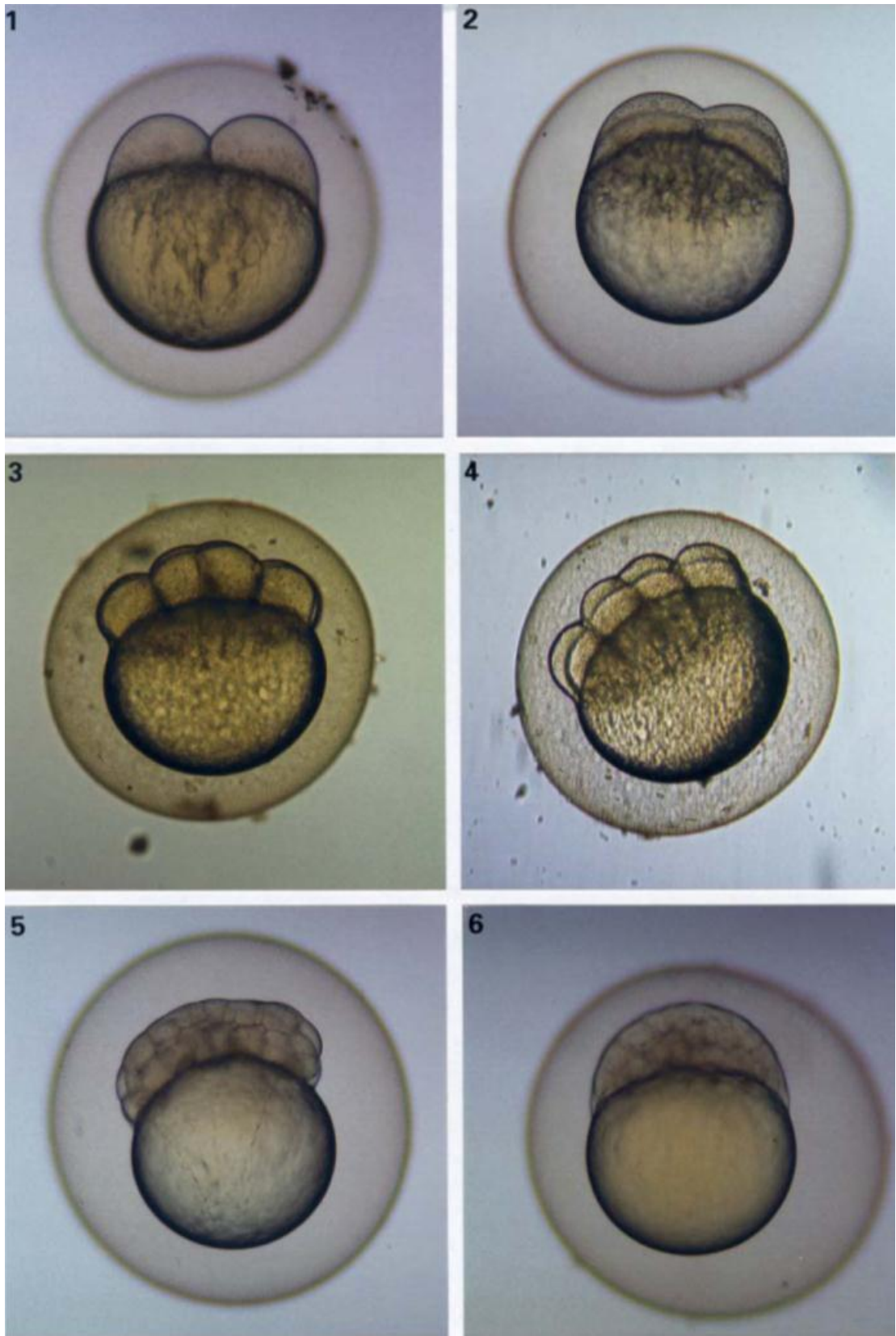
**Slika 1. Odabrane faze ranog razvoja zebrice (*Danio rerio*): 0,2 – 1,75 sati nakon oplodnje (iz: Kimmel *et al.* 1995 (35.)). S pomoću vremenskog slijeda normalnog razvoja mogu se dijagnosticirati i oplodnja i iskoristivost jajašaca (vidjeti stavak 26.: Odabir oplodjenih jajašaca).**



**Slika 2. Odabrane faze kasnog razvoja zebrice (*Danio rerio*) (embrij bez koriona radi bolje vidljivosti): 22 sata – 48 sati nakon oplodnje (iz: Kimmel *et al.* 1995 (35.)).**



48 h

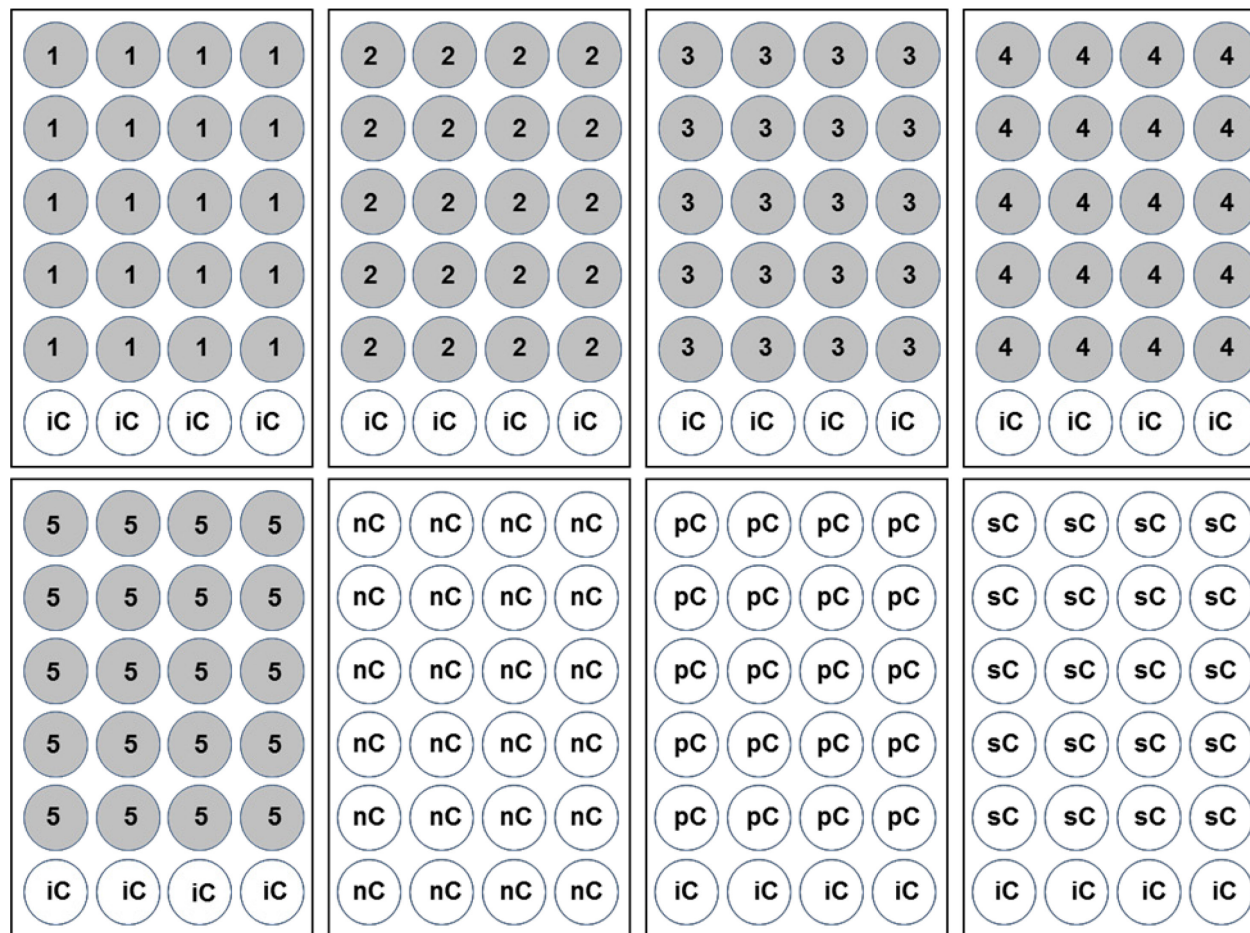


**Slika 3. Normalan razvoj embrija zebrice (*Danio rerio*):** (1) 0,75 sati, faza s 2 stanice; (2) 1 sat, faza s 4 stanice; (3) 1,2 sata, faza s 8 stanica; (4) 1,5 sati, faza s 16 stanica; (5) 4,7 sati, početak epibolije; (6) 5,3 sata, otprilike 50 % epibolije (iz: Braunbeck & Lammer 2006 (40.)).



#### Dodatak 4.

Slika 1. Nacrt ploča s 24 bunarića

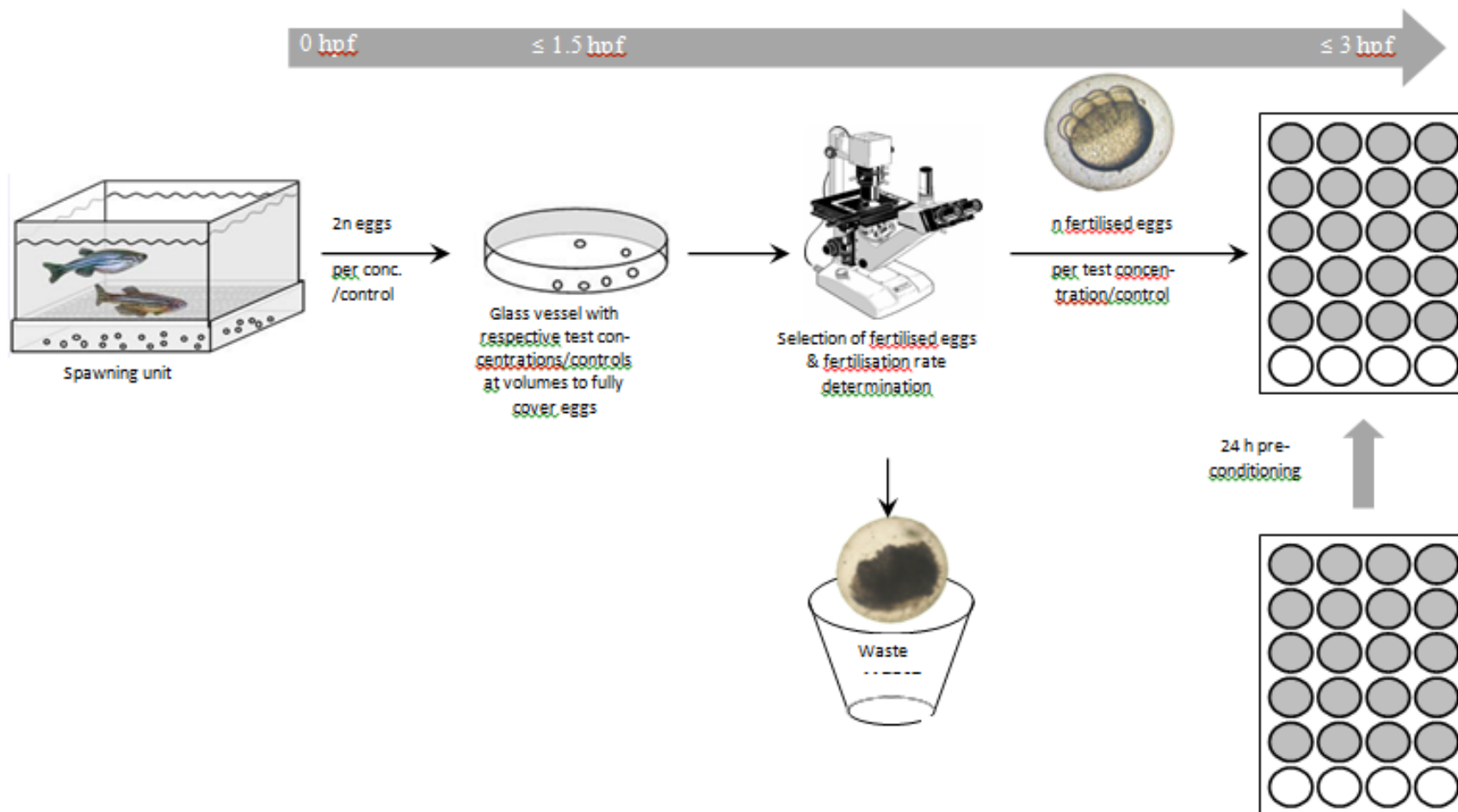


1 – 5 = pet ispitnih koncentracija po kemikaliji; nC = negativna kontrola (voda za razrjeđivanje); iC = kontrola unutar ploče (voda za

razrjedivanje);

pC = pozitivna kontrola (3,4-dikloroanilin 4 mg/l); sC = kontrola s otapalom

Slika 2. **Nacrt postupka ispitivanja akutne toksičnosti na embrijima zebrica (slijeva nadesno):** proizvodnja jajašaca, sakupljanje jajašaca, prethodno izlaganje u staklenim posudama odmah nakon oplodnje, odabir oplodjenih jajašaca s pomoću invertnog mikroskopa i/ili binokularnog mikroskopa i raspodjela oplodjenih jajašaca u pripremljene ploče s 24 bunarića s odgovarajućim ispitnim koncentracijama / kontrolama; n = broj jajašaca potrebnih po ispitnoj koncentraciji / kontroli (ovdje 20), hpf = sati nakon oplodnje.



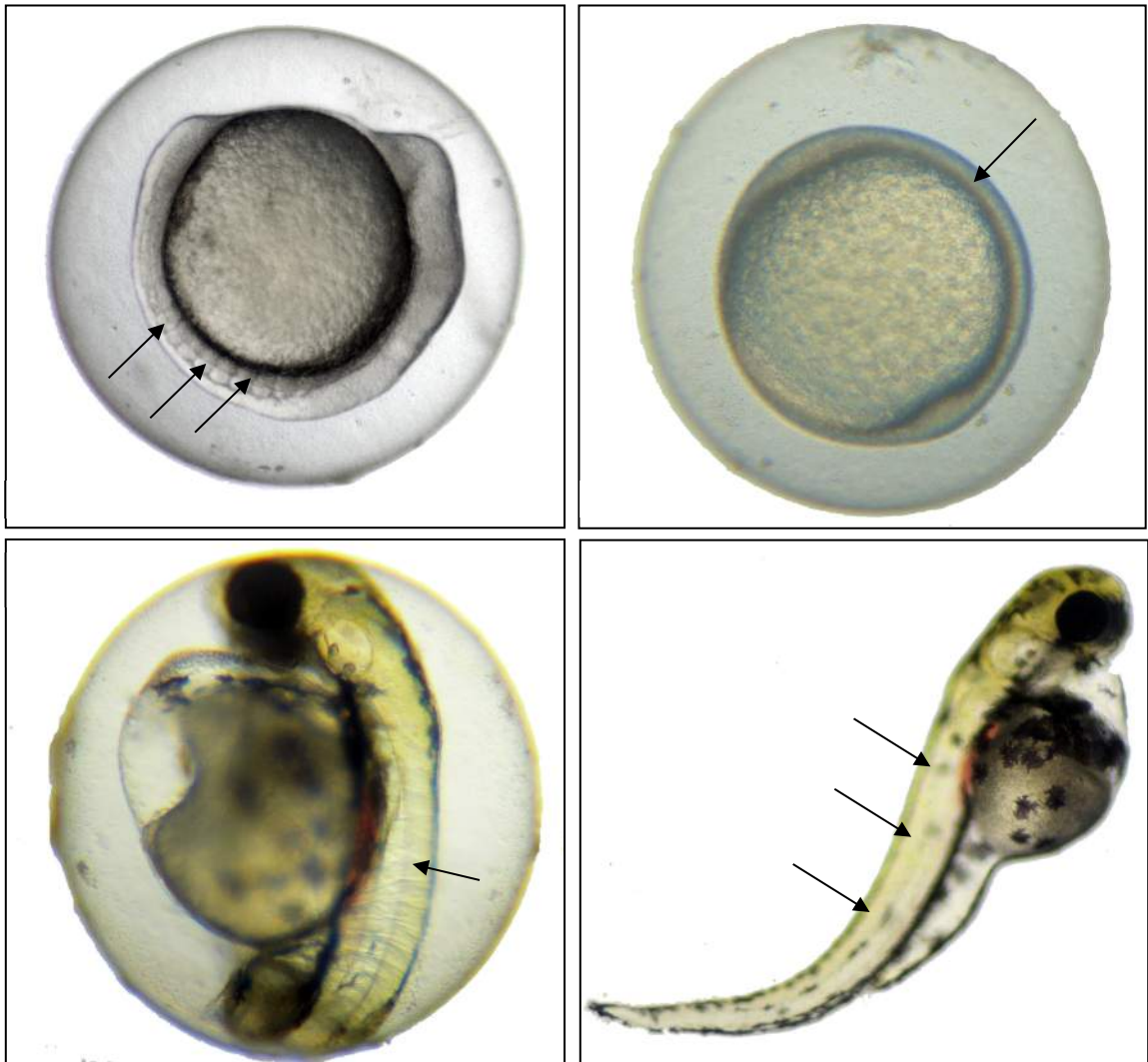
### Dodatak 5.

#### **PRIKAZ SMRTNIH KRAJNJIH TOČAKA ZA ISPITIVANJE AKUTNE TOKSIČNOSTI NA EMBRIJIMA ZEBRICA**

Sljedeće apikalne krajnje točke znak su akutne toksičnosti te, posljedično, smrti embrija: *koagulacija embrija, neodvajanje repa, izostanak formiranja somita i izostanak otkucaja srca*. Sljedeće mikrofotografije odabrane su za ilustraciju tih krajnjih točaka.



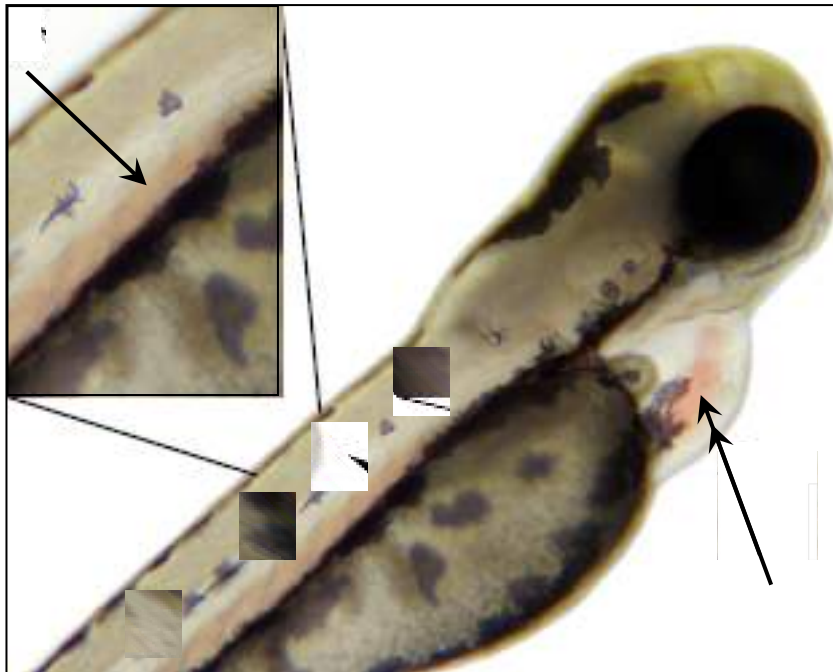
**Slika 1. Koagulacija embrija:** Pri promatranju uz jako osvjetljenje polja na koaguliranim embrijima zebrica vidljiv je niz neprozirnih nakupina.



**Slika 2. Izostanak formiranja somita:** Unatoč kašnjenju u razvoju za otprilike 10 sati, u embrija zebrice starog 24 sata na slici a) vide se dobro razvijeni somiti (→), dok u embrija na slici b) nema nikakvog znaka formiranja somita (→). Unatoč velikom edemu žumanjčane vrećice (\*), u embrija zebrice starog 48 sati na slici c) dobro se vide formirani somiti (→), dok u embrija zebrice starog 96 sati na slici d) nema nikakvog znaka formiranja somita (→). U embrija na slici d) zamjetni su i zakrivljenost kralježnice (skolioza) i perikardijalni edem (\*).



**Slika 3. Neodvajanje korijena repa** u bočnom prikazu (a: →; embrij zebrice star 96 sati). Zamjetno je i da nema osnove oka (\*).



**Slika 4. Izostanak otkucaja srca** po definiciji je teško pokazati na mikrofotografiji. Na izostanak otkucaja srca upućuje nekontrahirano srce (dvostruka strelica). Nepomičnost krvnih stanica u npr. trbušnoj aorti (→ u isječku) nije pokazatelj izostanka otkucaja srca. Zamjetan je i izostanak formiranja somita u ovog embrija (\*, homogen umjesto segmentiranog izgleda mišićnog tkiva). Da bi se zabilježio izostanak otkucaja srca, embrije je potrebno promatrati najmanje jednu minutu pod povećanjem od najmanje 80 puta.

## **C.50. Ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu bez sedimenta**

### **UVOD**

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 238 (2014.). Namijenjena je za procjenu toksičnosti kemikalija za klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*), podvodnu vodenu dvosupnicu, vrstu iz porodice krocanja. Temelji se na postojećoj ASTM-ovoj ispitnoj metodi (1.) modificiranoj za ispitni sustav bez sedimenta (2.) radi procjene intrinzične ekotoksičnosti ispitivanih kemikalija (neovisno o raspodjeli ispitivane kemikalije u vodi i sedimentu). Ispitni sustav bez sedimenta analitički je manje složen (samo vodena faza) i rezultati se mogu analizirati paralelno i/ili u usporedbi s rezultatima dobivenima ispitivanjem na *Lemna sp.* (3.); usto, zbog potrebnih sterilnih uvjeta minimalizirani su učinci mikroorganizama i alga (apsorpcija / razgradnja kemikalije itd.). Ovo ispitivanje ne zamjenjuje druga ispitivanja toksičnosti za vodene organizme, već bi trebalo biti nadopuna tim ispitivanjima radi cjelovitije procjene opasnosti i rizika za vodene biljke. Ispitna je metoda validirana međulaboratorijskim testom (4.).
2. Opisani su detalji ispitivanja s obnavljanjem (polustatičko) i bez obnavljanja (statičko) ispitne otopine. Ovisno o ciljevima ispitivanja i regulatornim zahtjevima, preporučuje se primjena polustatičke metode, npr. za tvari koje se brzo gube iz otopine zbog hlapljenja, adsorpcije, fotorazgradnje, hidrolize, taloženja ili biorazgradnje. Dodatne smjernice dostupne su u literaturi (5.). Ova ispitna metoda primjenjuje se za tvari za koje je ispitna metoda validirana (vidjeti pojedinosti u izvješću o međulaboratorijskom testu (4.)), formulacije ili poznate smjese; ako se ispituje smjesa, trebalo bi što detaljnije opisati kemijski identitet i količinu njezinih sastojaka. Ispitivanjem toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu bez sedimenta nadopunjuje se ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju u sustavu voda-sediment (6.). Prije primjene ove ispitne metode za ispitivanje smjese koje je namijenjeno u regulatornu svrhu trebalo bi razmotriti mogu li se tom metodom osigurati odgovarajući rezultati za tu svrhu, i zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

### **NAČELO ISPITIVANJA**

3. Kulturama klasastog krocnja (*Myriophyllum spicatum*) koje stalno rastu (samo u modificiranom Andrewsovom mediju, vidjeti Dodatak 2.) omogućuje se da rastu kao monokulture u različitim koncentracijama ispitivane kemikalije u sustavu bez sedimenta 14 dana. Cilj je ispitivanja kvantificirati učinke kemikalije na vegetativni rast tijekom tog razdoblja ocjenjivanjem odabranih mjernih varijabli. Mjerne varijable su rast tj.

povećanje duljine izdanka, bočnih grana i korijenja, povećanje svježe i suhe mase te povećanje broja pršljena. Usto, promatraju se i prepoznatljive kvalitativne promjene ispitnih organizama, kao što su izobličenje, kloroza, koja je prepoznatljiva po žutoj boji, i nekroza, prepoznatljiva po bijeloj ili smeđoj boji. Da bi se kvantificirali učinci kemikalije, rast u ispitnim otopinama uspoređuje se s rastom u kontrolama te se utvrđuje koncentracija koja uzrokuje određeni postotak (x %) inhibicije rasta i izražava se kao  $EC_x$ ; „x” može biti bilo koja vrijednost, ovisno o regulatornim zahtjevima, npr.  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ . Treba napomenuti da su procjene  $EC_{10}$  i  $EC_{20}$  pouzdane i primjerene samo u ispitivanjima u kojima su koeficijenti varijacije za kontrolne biljke niži od razine učinka koji se procjenjuje, tj. za pouzdanu procjenu  $EC_{20}$  koeficijent varijacije trebao bi biti < 20 %.

4. Trebalo bi odrediti prosječnu specifičnu brzinu rasta (na temelju procjena duljine glavnog izdanka i triju drugih mjernih varijabli) i prirast (na temelju povećanja duljine glavnog izdanka i triju drugih mjernih varijabli) netretiranih i tretiranih biljaka. Na temelju specifične brzine rasta (r) i prirasta (y) zatim se određuju  $E_rC_x$  (npr.  $E_rC_{10}$ ,  $E_rC_{20}$ ,  $E_rC_{50}$ ) odnosno  $E_yC_x$  (npr.  $E_yC_{10}$ ,  $E_yC_{20}$ ,  $E_yC_{50}$ ).
5. Usto se mogu statistički odrediti i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC).

## **PODACI O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI**

6. Mora biti raspoloživa analitička metoda odgovarajuće osjetljivosti za kvantifikaciju ispitivane kemikalije u ispitnom mediju. Za određivanje ispitnih uvjeta korisno je imati podatke o ispitivanoj kemikaliji kao što su strukturalna formula, čistoća i nečistoće, topljivost u vodi, stabilnost u vodi i na svjetlosti, konstanta disocijacije kiseline ( $pK_a$ ), koeficijent razdjeljenja oktanol/voda ( $K_{ow}$ ), tlak pare i biorazgradivost. Topljivost u vodi i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, iz koje se može zaključiti mogu li se u razdoblju ispitivanja očekivati značajni gubitci ispitivane kemikalije. Tako se može zaključiti treba li poduzeti određene mjere za kontrolu tih gubitaka. Ako podaci o topljivosti i stabilnosti ispitivane kemikalije nisu pouzdani, preporučuje se da se topljivost i stabilnost procijene u uvjetima ispitivanja, tj. u uzgojnom mediju te pri temperaturi i osvjetljenju koji će se upotrebljavati tijekom ispitivanja.
7. Kontrola pH-vrijednosti ispitnog medija posebno je važna, npr. pri ispitivanju metala ili tvari koje su hidrolitički nestabilne. Dodatne smjernice za ispitivanje kemikalija čija fizikalno-kemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u Smjernicama OECD-a (5.).

## **VALJANOST ISPITIVANJA**

8. Da bi ispitivanje bilo valjano, vrijeme udvostručenja duljine glavnog izdanka u kontroli



mora biti kraće od 14 dana. Taj se kriterij može ispuniti primjenom statičkog ili polustatičkog ispitivanja uz medije i ispitne uvjete opisane u ovoj metodi.

9. Srednji koeficijent varijacije za prirast na temelju mjerenja svježe mase izdanka (od početka do kraja ispitivanja) i dodatnih mjernih varijabli (vidjeti stavak 37.) u kontrolnim kulturama ne prelazi 35 % između ponovljenih uzoraka.
10. Više od 50 % ponovljenih uzoraka kontrolne skupine održavaju se sterilnima, tj. bez vidljivih onečišćenja drugim organizmima kao što su alge, gljivice i bakterije (bistra otopina), tijekom razdoblja izlaganja od 14 dana. *Napomena:* smjernice o tome kako procijeniti sterilnost dostupne su u izvješću o međulaboratorijskom testu (4.).

## REFERENTNA KEMIKALIJA

11. Referentna kemikalija (ili više njih), kao što je 3,5-diklorofenol, koji je upotrijebljen u međulaboratorijskom testu (4.), može se ispitati radi provjere ispitnog postupka; prema podacima iz međulaboratorijskog testa srednje su vrijednosti  $EC_{50}$  3,5-diklorofenola za različite varijable odgovora (vidjeti stavke 37. – 41. ove ispitne metode) između 3,2 mg/l i 6,9 mg/l (za pojedinih o intervalu pouzdanosti za te vrijednosti vidjeti izvješće o međulaboratorijskom testu). Preporučljivo je da se referentna kemikalija ispita barem dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje provodi rjeđe, istovremeno s određivanjem toksičnosti ispitivane kemikalije.

## OPIS METODE

### Oprema

12. Sva oprema koja dolazi u dodir s ispitnim medijima trebala bi biti izrađena od stakla ili drugog kemijski inertnog materijala. Staklenu opremu koja se upotrebljava za uzgoj i ispitivanje trebalo bi očistiti od kemijskih onečišćivača koji bi mogli dospjeti u ispitni medij i trebala bi biti sterilna. Ispitne posude trebale bi biti dovoljno duge da izdanci u kontrolnim posudama mogu rasti u vodenoj fazi, a da ne dosegnu površinu ispitnog medija na kraju ispitivanja. Preporučuju se staklene epruvete s debelim stijenkama od borosilikatnog stakla, bez izljeva na vrhu, unutarnjeg promjera približno 20 mm, duljine približno 250 mm, s aluminijskim čepovima.
13. Budući da modificirani Andrewsov medij sadržava saharozu (koja potiče rast gljivica i bakterija), ispitne otopine moraju se pripremati u sterilnim uvjetima. Sve tekućine i oprema steriliziraju se prije upotrebe. Sterilizacija se provodi tretiranjem zagrijanim zrakom (210 °C) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Usto, sve tikvice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

14. Kulture i ispitne posude ne smiju se držati zajedno. To je najlakše postići ako se upotrebljavaju odvojene uzgojne komore, inkubatori ili prostorije. Trebalo bi se moći kontrolirati osvjetljenje i temperaturu te ih održavati na stalnoj razini.

### **Ispitni organizam**

15. Klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*), podvodna vodena dvosupnica, vrsta je iz porodice krocjanja. Između lipnja i kolovoza njezini sitni ružičasto-bijeli cvjetići izlaze iznad površine vode. Biljke su ukorijenjene u tlo sustavom čvrstih rizoma. Mogu se pronaći u cijeloj sjevernoj hemisferi u eutrofičnim, no neonečišćenim vodama stajaćicama bogatijima kalcijem i s muljevitim supstratom. Klasasti krocanj bolje uspijeva u slatkim vodama, no može se pronaći i u bočatim vodama.
16. Za ispitivanje toksičnosti u sustavu bez sedimenta potrebne su sterilne biljke. Ako laboratorij koji provodi ispitivanje nema potrebne kulture klasastog krocjanja, može preuzeti sterilni biljni materijal iz drugog laboratorija ili prikupiti (nesterilni) biljni materijal u prirodi odnosno nabaviti ga od komercijalnog dobavljača; za biljke prikupljene u prirodi potrebna je taksonomska provjera vrste. Ako se biljke prikupljaju u prirodi ili nabavljaju od komercijalnog dobavljača, potrebno ih je sterilizirati (1.) te držati u kulturi u istom mediju kakav će se upotrebljavati u ispitivanju najmanje osam tjedana prije upotrebe. Na mjestima na kojima se prikupljaju polazne kulture ne smije biti očitih izvora onečišćenja. Pri prikupljanju klasastog krocjanja u prirodi treba posebno pripaziti da se prikuplja odgovarajuća vrsta, posebno u regijama u kojima može hibridizirati s drugim vrstama krocjanja. Ako se kulture nabavljaju iz drugog laboratorija, treba ih držati u sličnim uvjetima najmanje tri tjedna. Uvijek treba navesti podrijetlo biljnog materijala i vrstu koja se upotrebljava za ispitivanje.
17. Biljke koje će se upotrijebiti za ispitivanje trebalo bi pažljivo odabrati jer će njihova kvaliteta i jednolikost znatno utjecati na rezultate ispitivanja. Trebalo bi upotrebljavati mlade biljke koje brzo rastu i nemaju vidljivih oštećenja ni promjena boje (kloroza). Pojednosti o pripremi ispitnih organizama navedene su u Dodatku 4.

### **Uzgoj kulture**

18. Kako bi rjeđe bilo potrebno održavati kulture (npr. kad određeno vrijeme nisu planirana ispitivanja s krocnjem), kulture se mogu držati pod smanjenim osvjetljenjem i na nižoj temperaturi ( $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Pojednosti o uzgoju navedene su u Dodatku 3.
19. Najmanje 14 dana – 21 dan prije ispitivanja dovoljan broj ispitnih organizama aseptički se prenosi u svježi sterilni medij i uzgaja 14 dana – 21 dan u ispitnim uvjetima kao pretkultura. Pojednosti za pripremu pretkulture navedene su u Dodatku 4.

### **Ispitni medij**

20. Za klasati krocanj u ispitnom sustavu bez sedimenta preporučuje se samo jedan hranjivi medij, kako je opisano u Dodatku 2. Za uzgoj kulture klasastog krocnja i ispitivanje na njemu preporučuje se modifikacija Andrewsova medija kako je opisano u (1.). Modificirani Andrewsov medij pripravlja se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih otopina s dodatkom 3 % saharoze. Pojednosti o pripremi medija navedene su u Dodatku 2.
21. Za dobivanje ispitnih otopina potreban je deseterostruko koncentrirani modificirani Andrewsov medij (uz razrjeđivanje prema potrebi). Sastav medija naveden je u Dodatku 2.

### **Ispitne otopine**

22. Ispitne se otopine obično pripremaju razrjeđivanjem matične otopine. Matične otopine ispitivane kemikalije obično se pripremaju otapanjem kemikalije u demineraliziranoj (tj. destiliranoj ili deioniziranoj) vodi. Hranjive tvari dodaju se iz deseterostruko koncentriranoga modificiranog Andrewsova medija.
23. Matične otopine ispitivane kemikalije mogu biti sterilizirane u autoklavu na 121 °C 20 minuta ili sterilnom filtracijom, ako tehnika sterilizacije ne denaturira ispitivanu kemikaliju. Ispitne otopine mogu biti pripremljene i u sterilnoj demineraliziranoj vodi ili mediju, u sterilnim uvjetima. Pri odabiru postupka sterilizacije matičnih otopina ispitivane kemikalije trebalo bi uzeti u obzir termostabilnost i adsorpciju na različitim površinama. Zbog toga se preporučuje da se matične otopine pripremaju u sterilnim uvjetima, tj. koristeći se sterilnim materijalom za otapanje ispitivane kemikalije u sterilnim uvjetima (npr. sterilizacija plamenom, sterilizacija u komorama sa laminarnim protokom itd.) u sterilnoj vodi. Ova tehnika pripreme sterilnih matičnih otopina valjana je i za tvari i za smjese.
24. Najviša ispitna koncentracija ispitivane kemikalije u pravilu ne bi smjela biti viša od topljivosti te kemikalije u vodi u ispitnim uvjetima. Za ispitivane kemikalije slabe topljivosti u vodi možda će biti potrebno pripremiti koncentriranu matičnu otopinu ili disperziju kemikalije s pomoću organskog otapala ili dispergenta kako bi se olakšalo dodavanje točnih količina ispitivane kemikalije u ispitni medij te ubrzalo njezinu disperziju i otapanje. Treba svakako nastojati izbjeći upotrebu takvih materijala. Pomoćna otapala ili dispergenti koji se upotrijebe ne bi smjeli djelovati fitotoksično. Neka od otapala u širokoj uporabi koja nemaju fitotoksično djelovanje u koncentracijama do 100 µl/l su aceton i dimetilformamid. Ako se upotrebljava otapalo ili dispergent, treba navesti njegovu konačnu koncentraciju, koju treba svesti na najmanju moguću mjeru ( $\leq 100 \mu\text{l/l}$ ), te voditi računa da sve tretirane i kontrolne skupine sadržavaju istu koncentraciju otapala odnosno dispergenta. Dodatne smjernice o upotrebi dispergenata dostupne su u literaturi (5.).

## Ispitne i kontrolne skupine

25. Prethodna saznanja o toksičnosti ispitivane kemikalije za klasasti krocanj na temelju ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u odabiru prikladnih ispitnih koncentracija. U glavnom ispitivanju toksičnosti u pravilu je potrebno pet (kao u testu inhibicije rasta *Lemna sp.*, poglavlje C.26. ovog Priloga) do sedam ispitnih koncentracija raspoređenih u geometrijskom nizu; treba ih odabrati tako da vrijednosti NOEC i EC<sub>50</sub> budu unutar raspona koncentracija (vidjeti u nastavku). Ispitne se koncentracije po mogućnosti ne bi smjele razlikovati za faktor veći od 3,2; no vrijednost može biti i veća ako je krivulja koncentracija-odgovor ravna. Ako se upotrebljava manje od pet koncentracija, treba dati obrazloženje. Potrebno je najmanje pet ponovljenih uzoraka za svaku ispitnu koncentraciju.
26. Pri određivanju raspona ispitnih koncentracija (za ispitivanje za utvrđivanje raspona i/ili glavno ispitivanje toksičnosti) trebalo bi uzeti u obzir sljedeće:
- da bi se pri određivanju EC<sub>x</sub> osigurala primjerena razina pouzdanosti, vrijednost EC<sub>x</sub> mora biti između najviše i najniže ispitne koncentracije. Primjerice, ako se procjenjuje EC<sub>50</sub>, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti viša od EC<sub>50</sub>. Ako je vrijednost EC<sub>50</sub> izvan raspona ispitnih koncentracija, pripadajući intervali pouzdanosti bit će veliki i možda neće biti moguće ispravno procijeniti statističku prikladnost modela.
- Ako je cilj procijeniti LOEC/NOEC, najniža ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno niska da rast ne bude znatno manji od rasta u kontroli. Isto tako, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno visoka da rast bude znatno manji nego u kontroli. U protivnom je ispitivanje potrebno ponoviti s drugim rasponom koncentracija (osim ako je najviša koncentracija na granici topljivosti ili jednaka maksimalnoj predviđenoj graničnoj koncentraciji, npr. 100 mg/l).
27. Svako ispitivanje trebalo bi uključivati kontrole u kojima su hranjivi medij, ispitni organizam (odabir što je više moguće homogenog biljnog materijala, svježe bočne grane iz pretkultura skraćene na 2,5 cm od baze), okolni uvjeti i postupci isti kao u ispitnim posudama, ali bez ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljava pomoćno otapalo ili dispergent, potrebna je dodatna kontrola koja sadržava istu koncentraciju otapala/dispergenta kao i posude s ispitivanom kemikalijom. Potrebno je barem 10 kontrolnih posuda kao ponovljenih uzoraka (i posuda s otapalom, ako se ono upotrebljava).
28. Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji. No svakako je potrebno barem 10 kontrolnih ponovljenih uzoraka.

## Izlaganje

29. Svježe bočne grane iz pretkulture skraćene na 2,5 cm od baze nasumično se raspoređuju

po ispitnim posudama u aseptičkim uvjetima; svaka ispitna posuda trebala bi sadržavati po jednu bočnu granu dugu 2,5 cm s apikalnim meristemom na jednom kraju. Odabrani biljni materijal u svim posudama trebao bi biti jednake kvalitete.

30. Ispitne posude treba nasumično rasporediti po inkubatoru kako bi se minimizirao utjecaj prostornih razlika u intenzitetu svjetlosti i temperaturi. Usto ih je potrebno pri promatranju rasporediti zajedno u blokove ili nasumično premještati posude (ili ih češće premještati).
31. Ako preliminarno ispitivanje stabilnosti pokaže da se koncentracija ispitivane kemikalije ne može održati (tj. izmjerena koncentracija pada ispod 80 % od izmjerene početne koncentracije) tijekom razdoblja ispitivanja (14 dana), preporučuje se polustatičko ispitivanje. U tom slučaju biljke bi trebalo izložiti svježe pripremljenim ispitnim i kontrolnim otopinama najmanje jednom tijekom ispitivanja (npr. 7. dan). Učestalost izlaganja svježem mediju ovisit će o stabilnosti ispitivane kemikalije; za vrlo nestabilne ili hlapljive kemikalije možda će biti potrebno češće izlaganje da bi se održale približno stalne koncentracije.
32. Ova ispitna metoda ne obuhvaća izlaganje folijarnom primjenom (raspršivanje po lišću).

### **Ispitni uvjeti**

33. Za rasvjetu bi se trebalo koristiti toplim i/ili hladnim bijelim fluorescentnim svjetlom od  $100 - 150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  izmjereno kao fotosintetski aktivno zračenje (400 – 700 nm) na točkama koje su jednako udaljene od izvora svjetlosti kao i dno ispitnih posuda (jednako osvjetljenju od 6 000 – 9 000 lux) te u ciklusu svjetlost-tama od 16 : 8 h. Metoda detekcije i mjerenja svjetlosti, posebno vrsta senzora, utjecat će na izmjerenu vrijednost. Sferičnim sensorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad i ispod mjerne ravnine) i „kosinusnim” sensorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad mjerne ravnine) daje se prednost u odnosu na usmjerene senzore jer bolje mjere vrijednosti za višetočkasti izvor svjetlosti kakav je ovdje opisan.
34. Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posebnu pozornost treba obratiti na pomak pH-vrijednosti u nekim slučajevima, npr. kad se ispituju nestabilne kemikalije ili metali; pH-vrijednost trebala bi ostati u rasponu 6 – 9. Za dodatne smjernice vidjeti (5.).

### **Trajanje**

35. Ispitivanje završava 14 dana nakon prenošenja biljaka u ispitne posude.

### **Mjerenja i analitička određivanja**

36. Na početku ispitivanja duljina glavnog izdanka ispitnog organizma je 2,5 cm (vidjeti stavak 29.); mjeri se pomičnim mjerilom (vidjeti Dodatak 4.) ili fotografiranjem i

analizom slike. Duljinu glavnog izdanka ispitnog organizma koji izgleda normalno ili neuobičajeno treba odrediti na početku ispitivanja, najmanje jedanput tijekom 14-dnevnog razdoblja izlaganja i na kraju ispitivanja. Napomena: kao alternativa za one kojima nije dostupna analiza slika, ako je radna površina sterilizirana prije stavljanja biljaka u ispitne posude, duljina glavnog izdanka može se izmjeriti i sterilnim pomičnim mjerilom na početku i tijekom ispitivanja. Treba zabilježiti sve promjene u razvoju biljaka npr. deformaciju izdanka, izgled, naznake nekroze, klorozu, raspadanje ili gubitak sposobnosti plutanja te promjene duljine i izgleda korijenja. Treba zabilježiti i bitne značajke ispitnog medija (npr. prisutnost neotopljenog materijala, rast algi, gljivica ili bakterija u ispitnoj posudi).

37. Uz određivanja duljine glavnog izdanka tijekom ispitivanja, trebalo bi procijeniti i učinke ispitivane kemikalije na tri sljedeće mjerne varijable (ili više njih):

- i. ukupna duljina bočnih grana;
- ii. ukupna duljina izdanka;
- iii. ukupna duljina korijenja;
- iv. svježa masa;
- v. suha masa;
- vi. broj pršljena.

Napomena 1.: opažanja tijekom ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u odabiru odgovarajućih dodatnih mjerenja šest navedenih varijabli.

Napomena 2.: svakako je poželjno odrediti svježu i suhu masu (parametri iv. i v.).

Napomena 3.: zbog činjenice da saharoza i svjetlost (izloženost korijenja svjetlosti tijekom ispitivanja) mogu utjecati na nositelje auksina (biljni hormon rasta) i da neke kemikalije mogu imati način djelovanja sličan djelovanju auksina, upitno je treba li uključiti krajnju točku koja se odnosi na korijen (parametar iii.).

Napomena 4.: rezultati međulaboratorijskog ispitivanja pokazuju velike koeficijente varijacije (> 60 %) za ukupnu duljinu bočnih grana (parametar i.). Ukupna duljina bočnih grana u svakom je slučaju uključena u mjeru ukupne duljine izdanka (parametar ii.) koja pokazuje prihvatljivije koeficijente varijacije od < 30 %.

Napomena 5.: s obzirom na navedeno, glavne krajnje točke koje je preporučljivo mjeriti su: ukupna duljina izdanka, svježa masa i suha masa (parametri ii., iv. i v.); mjerenje parametra vi. (broj pršljena) ovisi o izboru izvođača pokusa.

38. Prednost je duljine glavnog izdanka i broja pršljena u tome što ih se može odrediti za svaku ispitnu i kontrolnu posudu na početku, za vrijeme i na kraju ispitivanja fotografiranjem i analizom slike, iako se može upotrijebiti i (sterilno) pomično mjerilo.

39. Ukupna duljina bočnih grana, ukupna duljina korijena (kao zbroj svih bočnih grana ili korijena) te ukupna duljina izdanka (kao zbroj duljine glavnog izdanka i ukupne duljine bočnih grana) mogu se mjeriti pomičnim mjerilom na kraju izlaganja.
40. Svježiu i/ili suhu masu trebalo bi odrediti na početku ispitivanja na uzorku pretkulture reprezentativnom za biljni materijal koji se upotrebljava na početku ispitivanja te na kraju ispitivanja na biljnom materijalu iz svake ispitne i kontrolne posude.
41. Ukupna duljina bočnih grana, ukupna duljina izdanka, ukupna duljina korijena, svježa masa, suha masa i broj pršljena mogu se odrediti kako slijedi:
- i. ukupna duljina bočnih grana: duljina bočnih grana može se odrediti mjerenjem svih bočnih grana pomičnim mjerilom na kraju izlaganja. Ukupna duljina bočnih grana zbroj je duljina svih bočnih grana u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi;
  - ii. ukupna duljina izdanka: duljina glavnog izdanka može se odrediti analizom slike ili pomičnim mjerilom. Ukupna duljina izdanka zbroj je ukupne duljine bočnih grana i duljine glavnog izdanka u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi na kraju izlaganja;
  - iii. ukupna duljina korijena: ukupna duljina korijena može se odrediti mjerenjem svih korijena pomičnim mjerilom na kraju izlaganja. Ukupna duljina korijena zbroj je duljina svih korijena u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi;
  - iv. svježa masa: svježa masa može se odrediti vaganjem ispitnih organizama na kraju izlaganja. Sav biljni materijal iz svake ispitne i kontrolne posude ispire se destiliranom vodom i lagano suši celuloznim papirom. Nakon te pripreme svježa masa određuje se vaganjem. Početna biomasa (svježa masa) određuje se na temelju uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda;
  - v. suha masa: nakon pripreme za određivanje svježe mase, ispitni organizmi suše se na 60 °C dok ne dosegnu konstantnu masu. Ta je masa suha masa. Početna biomasa (suha masa) određuje se na temelju uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda;
  - vi. broj pršljena: broje se svi pršljeni na glavnom izdanku.

#### *Učestalost mjerenja i analitičkih određivanja*

42. Ako se primjenjuje statičko ispitivanje, trebalo bi na početku i kraju ispitivanja odrediti pH svake tretirane skupine. Ako se primjenjuje polustatičko ispitivanje, pH bi trebalo izmjeriti u svakoj šarži „svježe” ispitne otopine prije svakog obnavljanja te u odgovarajućim „potrošenim” otopinama.
43. Intenzitet svjetlosti trebalo bi mjeriti u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji, na točkama koje su jednako udaljene od izvora svjetlosti kao i ispitni organizmi. Mjerenja bi trebalo provesti najmanje jedanput tijekom ispitivanja. Usto najmanje jedanput dnevno (ili neprekidno, s pomoću uređaja za automatsko bilježenje podataka) treba bilježiti

temperaturu medija u zamjenskoj posudi koja se drži u istim uvjetima u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji.

44. Koncentracije ispitivane kemikalije (ili više kemikalija) određuju se u prikladnim razmacima tijekom ispitivanja. U statičkom ispitivanju koncentracije se moraju odrediti barem na početku i na kraju ispitivanja.
45. U polustatičkom ispitivanju u kojemu se očekuje da koncentracija ispitivane kemikalije (ili više kemikalija) neće ostati u granicama od  $\pm 20\%$  nazivne koncentracije potrebno je analizirati sve svježe pripremljene ispitne otopine i ponoviti analizu pri svakom obnavljanju otopine. Međutim, u svim ispitivanjima u kojima izmjerene početne koncentracije ispitivane kemikalije (ili više kemikalija) nisu u granicama od  $\pm 20\%$  nazivne koncentracije, ali ima dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. unutar područja od 80 – 120 % početne koncentracije), kemijska se određivanja mogu provoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji. U svakom slučaju, određivanje ispitnih koncentracija prije obnavljanja potrebno je provesti samo na po jednoj posudi za svaku ispitnu koncentraciju (ili na združenom sadržaju posuda iste koncentracije).
46. Ako se može dokazati da se ispitna koncentracija tijekom cijelog ispitivanja na zadovoljavajući način održavala u granicama od  $\pm 20\%$  nazivne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata može se temeljiti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima. Ako je odstupanje od nazivne ili izmjerene početne koncentracije veće od  $\pm 20\%$ , analiza rezultata treba se temeljiti na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tijekom izlaganja ili na modelima kojima se opisuje pad koncentracije ispitivane kemikalije (5.).

### **Ispitivanje granične koncentracije**

47. U određenim okolnostima, npr. kad preliminarno ispitivanje ukazuje na to da ispitivana kemikalija ne djeluje toksično u koncentraciji do 100 mg/l ili do granice svoje topljivosti u ispitnom mediju, odnosno, ako je riječ o formulaciji, do granice disperzivnosti, može se provesti ispitivanje granične koncentracije koje uključuje usporedbu odgovora kontrolne skupine s odgovorom jedne tretirane skupine (100 mg/l ili koncentracija koja odgovara granici topljivosti). Preporučuje se da se uz ispitivanje granične koncentracije svakako provede i analiza koncentracije za izlaganje. Svi navedeni ispitni uvjeti i kriteriji valjanosti vrijede i za ispitivanje granične koncentracije, s time da broj tretiranih ponovljenih uzoraka treba udvostručiti. Rast u kontrolnoj i tretiranoj skupini može se analizirati statističkim testom za usporedbu srednjih vrijednosti, npr. Studentovim t-testom.



## PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

### Varijable odgovora

48. Svrha je ispitivanja odrediti učinke ispitivane kemikalije na vegetativni rast klasastog krocnja (*Myriophyllum spicatum*). U ovoj ispitnoj metodi opisane su dvije varijable odgovora:

- a) prosječna specifična brzina rasta: ta se varijabla odgovora izračunava na temelju promjena logaritama duljine glavnog izdanka, i usto na temelju promjena logaritama drugih mjernih parametara – ukupne duljine izdanka, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena – tijekom vremena (izraženo po danu) u kontrolama i svim tretiranim skupinama. Napomena: za mjerne parametre ukupnu duljinu bočnih grana i ukupnu duljinu korijena ne može se izračunati prosječna specifična brzina rasta. Na početku ispitivanja ispitni organizam nema bočne grane ni korijenje (nakon pripreme iz pretkulture); nakon početne vrijednosti nula, izračun prosječne specifične brzine rasta nije definiran;
- b) prirast: ta se varijabla odgovora izračunava na temelju promjena duljine glavnog izdanka, i usto na temelju promjena drugih mjernih parametara – najbolje ukupne duljine izdanka, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena, te drugih parametara ako se smatraju korisnima, u kontrolama i svim tretiranim skupinama do kraja ispitivanja.

49. Procjene toksičnosti trebale bi se temeljiti na duljini glavnog izdanka i trima dodatnim mjernim varijablama (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena, vidjeti stavak 37. i napomene 2., 4. i 5. uz taj stavak) jer neke kemikalije mogu utjecati na druge mjerne varijable znatno više nego na duljinu glavnog izdanka. Taj bi utjecaj ostao neotkriven kad bi se računala samo duljina glavnog izdanka.

#### *Prosječna specifična brzina rasta*

50. Prosječna specifična brzina rasta za određeno razdoblje izračunava se kao logaritamsko povećanje varijabli rasta – duljine glavnog izdanka i još triju mjernih varijabli (ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena) – primjenom formule u nastavku za svaki ponovljeni uzorak kontrolne i tretirane skupine:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t} \quad \mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

pri čemu je:

$\mu_{i-j}$  : prosječna specifična brzina rasta od vremena i do j

-  $N_i$  : mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu i

$N_j$  : mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu j

t : vremensko razdoblje od i do j

Za svaku tretiranu i kontrolnu skupinu treba izračunati srednju vrijednost brzine rasta i procjene varijance.

51. Prosječnu specifičnu brzinu rasta treba izračunati za čitavo razdoblje ispitivanja (vrijeme „i” u navedenoj formuli označava početak ispitivanja, a vrijeme „j” kraj ispitivanja). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prosječne specifične brzine rasta te procjene varijance. Usto je potrebno procijeniti i brzinu rasta u pojedinim etapama tijekom razdoblja izlaganja kako bi se ocijenili učinci ispitivane kemikalije koji se javljaju (npr. pregledom logaritamski transformiranih krivulja rasta).
52. Postotak inhibicije brzine rasta ( $I_r$ ) tada se može izračunati za svaku ispitnu koncentraciju (tretiranu skupinu) prema sljedećoj formuli:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

pri čemu je:

$\% I_r$  : postotak inhibicije prosječne specifične brzine rasta

$\mu_C$  : srednja vrijednost  $\mu$  u kontroli

$\mu_T$  : srednja vrijednost  $\mu$  u tretiranoj skupini

#### *Prirast*

53. Učinci na prirast određuju se na temelju mjerne varijable duljine glavnog izdanka i još triju mjernih varijabli (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena) u svakoj ispitnoj posudi na početku i na kraju ispitivanja. Za svježu ili suhu masu početna biomasa određuje se na temelju uzorka ispitnih organizama uzetog iz iste šarže koja je upotrijebljena za inokulaciju ispitnih posuda. Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prirasta i procjene varijance. Srednji postotak inhibicije prirasta ( $\% I_y$ ) za svaku tretiranu skupinu može se izračunati kako slijedi:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

pri čemu je:

$\% I_y$  : postotak smanjenja prirasta

$b_C$  : konačna biomasa u kontrolnoj skupini umanjena za početnu biomasu

$b_T$  : konačna biomasa u tretiranoj skupini umanjena za početnu biomasu

#### *Vrijeme udvostručenja*

54. Da bi se odredilo vrijeme udvostručenja ( $T_d$ ) duljine glavnog izdanka i utvrdilo je li ispunjen taj kriterij valjanosti (vidjeti stavak 8.), dobivene podatke za kontrolne posude treba uvrstiti u sljedeću formulu:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

pri čemu je  
52.

□ prosje□na s

### Prikaz krivulja koncentracija-odgovor

55. Treba izraditi krivulje koncentracija-odgovor kao prikaz odnosa srednje vrijednosti postotka inhibicije varijable odgovora ( $I_r$  ili  $I_y$ , izračunanih kako je navedeno u stavku 53.) i logaritma koncentracije ispitivane kemikalije.

### Procjena $EC_x$

56. Procjene  $EC_x$  trebale bi se temeljiti i na prosječnoj specifičnoj brzini rasta ( $E_rC_x$ ) i na prirastu ( $E_yC_x$ ), a svaka od njih bi se pak trebala temeljiti na duljini glavnog izdanka te eventualno drugim mjernim varijablama (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena). Razlog tomu je što neke kemikalije ne utječu jednako na duljinu glavnog izdanka i na druge mjerne varijable. Potrebni parametri toksičnosti stoga su četiri vrijednosti  $EC_x$  za svaku izračunanu razinu inhibicije  $x$ :  $E_rC_x$  (duljina glavnog izdanka),  $E_rC_x$  (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena),  $E_yC_x$  (duljina glavnog izdanka) i  $E_yC_x$  (najbolje ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena).
57. Treba napomenuti da vrijednosti  $EC_x$  izračunane primjenom tih dviju varijabli odgovora nisu usporedive i tu razliku treba uzeti u obzir pri korištenju rezultatima ispitivanja. Uz poštovanje ispitnih uvjeta ove ispitne metode, vrijednosti  $EC_x$  na temelju prosječne specifične brzine rasta ( $E_rC_x$ ) u većini će slučajeva biti više od rezultata na temelju prirasta ( $E_yC_x$ ) zbog razlike u matematičkoj osnovi tih dvaju pristupa. Tu razliku ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti tih dviju varijabli odgovora; jednostavno je riječ o matematički različitim vrijednostima.

### Statistički postupci

58. Cilj je dobiti kvantitativan odnos koncentracija-odgovor regresijskom analizom. Ako se provede linearizacijska transformacija podataka odgovora, npr. s pomoću probit, logit ili Weibullova modela (7.), može se primijeniti ponderirana linearna regresija; ipak, prednost se daje postupcima nelinearne regresije kojima se bolje rješavaju neizbježne nepravilnosti podataka i odstupanja od pravilnih distribucija. S približavanjem izostanku inhibicije ili potpunoj inhibiciji te se nepravilnosti transformacijom mogu i dodatno

povećati te tako otežati analizu (7.). Treba napomenuti da su standardne metode analize za vrijednosti probit, logit ili Weibull namijenjene kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) te se moraju posebno prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o brzini rasta i prirastu. Konkretni postupci za određivanje vrijednosti  $EC_x$  iz kontinuiranih podataka mogu se pronaći u literaturi (8., 9. i 10.).

59. Za svaku varijablu odgovora koja se analizira treba izračunati procjene vrijednosti  $EC_x$  na temelju odnosa koncentracija-odgovor. Po mogućnosti, za sve procjene treba odrediti granice pouzdanosti od 95 %. Valjanost podudaranja podataka odgovora s regresijskim modelom trebalo bi procijeniti grafički ili statistički. Regresijsku analizu trebalo bi provesti na temelju odgovora pojedinačnih ponovljenih uzoraka, a ne na temelju srednjih vrijednosti tretiranih skupina.
60. Ako raspoloživi regresijski modeli / regresijske metode nisu prikladni/-e za te podatke, procjene  $EC_{50}$  i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem (*bootstrapping*) (10.).
61. Za procjenu LOEC-a, a time i NOEC-a, potrebno je usporediti srednje vrijednosti tretiranih skupina primjenom tehnika analize varijance (ANOVA). Zatim srednju vrijednost za svaku koncentraciju treba usporediti sa srednjom vrijednošću kontrole primjenom odgovarajuće metode višestruke usporedbe ili testa trenda. Može biti koristan Dunnettov ili Williamsov test (12., 13., 14., 15., 16.). Treba provjeriti vrijedi li pretpostavka homogenosti varijanci ANOVA-e. To se može procijeniti grafički ili formalnim testom (15.). Prikladni su Leveneov ili Bartlettov test. Ako pretpostavka homogenosti varijanci nije ispunjena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanci prevelika i ne može se ispraviti transformacijom, treba razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Jonckheereovi „step-down” testovi trenda. Dodatne smjernice za određivanje NOEC-a mogu se pronaći u literaturi (10.).
62. Novije znanstvene spoznaje rezultirale su preporukom da se pojam NOEC-a napusti i zamijeni procjenama  $EC_x$  dobivenima regresijom. Za ovo ispitivanje s klasastim krocnjem nije utvrđena primjerena vrijednost  $x$ . Ipak, čini se da je primjeren raspon od 10 do 20 % (ovisno o odabranoj varijabli odgovora), a poželjno je da se navedu obje vrijednosti,  $EC_{10}$  i  $EC_{20}$ , te njihove granice pouzdanosti.

### Izveščivanje

63. Izvešće o ispitivanju treba obuhvaćati sljedeće:

*Ispitivana kemikalija*

tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- podaci za kemijsku identifikaciju tvari, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvedivo itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi),

tvar s više sastojaka, tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal (UVCB tvar) ili smjesa:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizikalno-kemijska svojstva sastojaka.

#### *Ispitne vrste*

- znanstveni naziv i podrijetlo.

#### *Ispitni uvjeti*

- ispitni postupak (statički ili polustatički),
- datum početka i trajanje ispitivanja,
- ispitni medij,
- opis plana ispitivanja: ispitne posude i pokrovi, količine otopina, duljina glavnog izdanka po ispitnoj posudi na početku ispitivanja,
- ispitne koncentracije (nazivne odnosno izmjerene, prema potrebi) i broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji,
- način pripreme matičnih i ispitnih otopina, uključujući eventualnu upotrebu otapala ili dispergenata,
- temperatura tijekom ispitivanja,
- izvor svjetlosti, intenzitet i homogenost svjetlosti,
- pH-vrijednosti ispitnih i kontrolnih medija,
- metoda analize ispitivane kemikalije s odgovarajućim podacima za procjenu kvalitete (validacijske studije, standardne devijacije ili granice pouzdanosti analiza),
- metode određivanja duljine glavnog izdanka i drugih mjernih varijabli, npr. ukupne

duljine bočnih grana, ukupne duljine izdanka, ukupne duljine korijena, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena,

- stanje kulture (sterilna ili nesterilna) u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom promatranju,
- sva odstupanja od ove ispitne metode.

### *Rezultati*

- neobrađeni podaci: duljina glavnog izdanka i druge mjerne varijable u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom promatranju i svakoj analizi,
- srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku mjernu varijablu,
- krivulje rasta za svaku mjernu varijablu,
- izračunane varijable odgovora za svaki tretirani ponovljeni uzorak, uključujući srednje vrijednosti i koeficijente varijacije za ponovljene uzorke,
- grafički prikaz odnosa koncentracija-učinak,
- procjene krajnjih točaka toksičnosti za varijable odgovora, npr.  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ , i pripadajući intervali pouzdanosti; ako se izračunavaju LOEC i NOEC, njihove vrijednosti i statističke metode koje su upotrijebljene za izračun,
- ako se primjenjuje ANOVA, jačina učinka koji se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),
- svaka stimulacija rasta u bilo kojoj tretiranoj skupini,
- svi vidljivi znakovi fitotoksičnosti i zapažanja u ispitnim otopinama,
- rasprava o rezultatima, uključujući i sve utjecaje na rezultate ispitivanja nastale uslijed odstupanja od ove ispitne metode.

## LITERATURA

1. ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
2. Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, str. 702-710.
3. Poglavlje C.26. ovog Priloga: Test inhibicije rasta *Lemna* sp.
4. OECD (2014), “*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.
5. OECD (2000), “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
6. Poglavlje C.51. ovog Priloga: Ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu voda-sediment.
7. Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
8. Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, str. 157-167.
9. Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, str. 1485-1494.
10. OECD (2006), “Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

11. Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
12. Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, str. 1096-1121.
13. Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, str. 482-491.
14. Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, str. 103-117.
15. Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, str. 519-531.
16. Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, str. 93-96.



## Dodatak 1.

### DEFINICIJE

**Biomasa** je svježa i/ili suha masa žive tvari u populaciji. U ovom ispitivanju biomasa je zbroj glavnog izdanka, svih bočnih grana i svog korijenja.

**Kemikalija** je tvar ili smjesa.

**Kloroza** je promjena zelene boje ispitnog organizma, posebno pršljena, u žućkastu.

**EC<sub>x</sub>** je koncentracija ispitivane kemikalije otopljene u ispitnom mediju koja uzrokuje smanjenje rasta klasastog krocnja od x % (npr. 50 %) u određenom razdoblju izlaganja (koje treba posebno navesti ako nije jednako cijelom ili uobičajenom vremenu trajanja ispitivanja). Da bi se jasno pokazalo je li vrijednost EC dobivena na temelju brzine rasta ili na temelju prirasta, upotrebljavaju se simboli „E<sub>r</sub>C” za brzinu rasta (*growth rate*) i „E<sub>y</sub>C” za prirast (*yield*), te se uz njih navodi mjerna varijabla koja je upotrijebljena, npr. E<sub>r</sub>C (duljina glavnog izdanka).

**Rast** je povećanje mjerne varijable, npr. duljine glavnog izdanka, ukupne duljine bočnih grana, ukupne duljine izdanka, ukupne duljine korijena, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena, tijekom razdoblja ispitivanja.

**Brzina rasta** (prosječna specifična brzina rasta) logaritamsko je povećanje mjerne varijable tijekom razdoblja izlaganja. Napomena: varijable odgovora povezane s brzinom rasta neovisne su o trajanju ispitivanja sve dok je rast neizloženih kontrolnih organizama eksponencijalan.

**Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC – lowest observed effect concentration)** najniža je ispitana koncentracija kemikalije pri kojoj je uočen statistički značajan učinak smanjenja rasta (pri  $p < 0,05$ ) u usporedbi s kontrolom u određenom razdoblju izlaganja. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati štetan učinak jednak onomu koji je zabilježen pri LOEC-u ili veći od njega. Ako ta dva uvjeta nisu ispunjena, treba detaljno obrazložiti kako je odabran LOEC (a prema tome i NOEC).

**Mjerna varijabla** je bilo koja varijabla koja se mjeri kako bi se izrazila krajnja točka ispitivanja s pomoću jedne varijable odgovora ili više različitih varijabli odgovora. U ovoj

ispitnoj metodi mjerne varijable su duljina glavnog izdanka, ukupna duljina bočnih grana, ukupna duljina izdanka, ukupna duljina korijena, svježa masa, suha masa i broj pršljena.

**Monokultura** je kultura jedne biljne vrste.

**Nekroza** je mrtvo (tj. bijelo ili tamno smeđe) tkivo ispitnog organizma.

**Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC – no observed effect concentration)** ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a.

**Varijabla odgovora** je varijabla za procjenu toksičnosti izvedena iz bilo koje mjerene varijable koja opisuje biomasu primjenom različitih metoda izračuna. Za ovu ispitnu metodu brzina rasta i prirast su varijable odgovora izvedene iz mjernih varijabli kao što su duljina glavnog izdanka, ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena.

**Polustatičko ispitivanje (s obnavljanjem)** ispitivanje je tijekom kojeg se ispitna otopina zamjenjuje periodički, u određenim razmacima.

**Statičko ispitivanje** ispitna je metoda u kojoj se ispitna otopina ne obnavlja tijekom ispitivanja.

**Ispitivana kemikalija** je bilo koja tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

**Krajnja točka ispitivanja** opći je faktor koji se mijenja u odnosu na kontrolu zbog djelovanja ispitivane kemikalije u skladu s ciljem ispitivanja. U ovoj ispitnoj metodi krajnja je točka ispitivanja inhibicija rasta, koja se može izraziti različitim varijablama odgovora koje se temelje na jednoj mjernoj varijabli ili više njih.

**Ispitni medij** cjelokupni je sintetički uzgojni medij u kojem biljke koje se upotrebljavaju za ispitivanje rastu tijekom izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Ispitivana je kemikalija obično otopljena u ispitnom mediju.

**UVCB** je tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal.

**Prirast** je vrijednost mjerne varijable kojom se izražava biomasa na kraju razdoblja izlaganja umanjena za vrijednost mjerne varijable na početku razdoblja izlaganja. Napomena: kada je rast neizloženih organizama eksponencijalan, varijable odgovora koje se temelje na prirastu smanjivat će se tijekom ispitivanja.

## Dodatak 2.

### MODIFICIRANI ANDREWSON MEDIJ ZA OSNOVNU KULTURU I PRETKULTURU

Modificirani Andrewsov medij potreban za osnovnu kulturu i pretkulturu pripravlja se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih otopina s dodatkom 3 % saharoze.

**Tablica 1.** Sastav Andrewsove hranjive otopine: (ASTM-ov standard E 1913-04)

Pripravljanje hranjivih matičnih otopina			Pripravljanje hranjive otopine
Matična otopina	Kemikalija	Početna masa na 1 000 ml	ml na 5 l hranjive otopine
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO <sub>3</sub>	8,08 g	
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	18,88 g	
2	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	9,86 g	50
3	Vidjeti u nastavku: matična otopina 3.1.		50
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g	50
5	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,278 g	50
	Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	0,372 g	

Matične otopine mogu se čuvati u hladnjaku šest mjeseci (na 5 – 10 °C). Samo matična otopina 5 ima kraći rok trajanja (dva mjeseca).

**Tablica 2.** Pripravljanje matične otopine 3.1 za pripremu matične otopine 3

Kemikalija	Početna masa u g/100 ml
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0,223
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,115
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,155
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,0125
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0,0037

Nakon što je matična otopina 3.1 pripravljena (tablica 2.), ona se zamrzava u alikvotima od približno 11 ml (na najmanje – 18 °C). Duboko smrznute doze otopine imaju rok trajanja od pet godina.

Da bi se pripravila matična otopina 3, treba odmrznuti matičnu otopinu 3.1, uliti 10 ml te otopine u odmjernu tikvicu od 1 l i dodati ultra čistu vodu do oznake na tikvici.

Za dobivanje modificiranog Andrewsova medija treba uliti približno 2500 ml ultra čiste vode u odmjernu tikvicu od 5 l. Nakon dodavanja po 50 ml svake matične otopine, 90 % odmjerne tikvice treba napuniti ultra čistom vodom i podesiti pH na 5,8.

Zatim treba dodati 150 g otopljene saharoze (3 % na 5 l) te napuniti odmjernu tikvicu ultra čistom vodom do oznake. Naposljetku se hranjiva otopina ulijeva u Schottove boce od 1 l i tretira u autoklavu na 121 °C 20 minuta.

Tako dobivena hranjiva otopina može ostati sterilna u hladnjaku (na 5 – 10 °C) tri mjeseca.

### **Modificirani Andrewsov medij za ispitivanje toksičnosti u sustavu bez sedimenta**

Deseterostruko koncentrirani modificirani Andrewsov medij koji je potreban za dobivanje ispitnih otopina priprema se od pet odvojeno pripremljenih hranjivih matičnih otopina iz tablica 1. i 2. s dodatkom 30 % saharoze. Za dobivanje takvog medija treba uliti približno 100 ml ultra čiste vode u odmjernu tikvicu od 1 l. Nakon dodavanja po 100 ml svake matične otopine treba podesiti pH na 5,8. Zatim treba dodati 30 % otopljene saharoze (300 g na 1 000 ml) te napuniti odmjernu tikvicu ultra čistom vodom do oznake.

Naposljetku se hranjiva otopina ulijeva u Schottove boce od 0,5 l i tretira u autoklavu na 121 °C 20 minuta.

Tako dobivena deseterostruko koncentrirana hranjiva otopina može ostati sterilna u hladnjaku (na 5 – 10 °C) tri mjeseca.

### Dodatak 3.

#### DRŽANJE OSNOVNE KULTURE

U ovom Dodatku opisuje se osnovna kultura klasastog krocnja – *Myriophyllum spicatum* L<sup>1</sup>, podvodne vodene dvosupnice, vrste iz porodice krocjanja. Između lipnja i kolovoza njezini sitni ružičasto-bijeli cvjetići izlaze iznad površine vode. Biljke su ukorijenjene u tlu sustavom čvrstih rizoma. Mogu se pronaći u cijeloj sjevernoj hemisferi u eutrofičnim, no neonečišćenim vodama stajalicama bogatijima kalcijem i s muljevitim supstratom. Klasasti krocjanj bolje uspijeva u slatkim vodama, no može se pronaći i u bočatim vodama.

Za osnovnu kulturu u sustavu bez sedimenta u laboratorijskim uvjetima potrebne su sterilne biljke. Sterilne biljke mogu se nabaviti iz ekotoksikološkog laboratorija njemačke Savezne agencije za okoliš (Umweltbundesamt).

Alternativno, ispitni organizmi mogu se pripremiti od nesterilnih biljaka u skladu s ASTM-ovim standardom E 1913-04. Vidjeti u nastavku: ulomak iz ASTM-ova Standardnog vodiča – postupak za uzgoj kulture *Myriophyllum sibiricum* prikupljene u prirodi:

„Ako se počinje raditi s nesterilnim biljkama *Myriophyllum sibiricum* prikupljenima u prirodi, treba prikupljati njihove pupove (turione) u jesen. Pupove treba staviti u akvarije od 20 l koji sadržavaju 5 cm sterilnog sedimenta prekrivenog silikatnim pijeskom ili primjerice materijalom Turface® i 18 l vode odgovarajuće čistoće. Akvariji se prozračuju i drže na temperaturi od 15 °C s brzinom protoka od 200 do 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  16 sati dnevno. Biljne kulture u akvariju mogu se držati kao rezervni izvor biljaka u slučaju da sterilne biljne kulture budu uništene zbog mehaničkih neispravnosti u odjeljku za uzgoj kulture, zbog kontaminacije, ili iz drugih razloga. Biljke koje se uzgajaju u akvariju nisu sterilne i sterilne kulture ne mogu se držati u šaržnom sustavu za uzgoj kultura. Za sterilizaciju kulture biljke se uklanjaju iz akvarija i ispiru u tekućoj deioniziranoj vodi oko pola sata. Zatim se dezinficiraju u aseptičkim uvjetima u komorama sa laminarnim protokom zraka manje od 20 minuta (dok većina biljnog tkiva ne izbijeli i samo vrh koji raste ostane zelen) u otopini s masenim udjelom natrijeva hipoklorita od 3 % i s 0,01 % odgovarajuće površinski aktivne tvari. Dezinfekcijsko sredstvo i biljni materijal se miješaju. Segmenti s više nodija prenose se u sterilne epruvete za uzgoj kultura koje sadržavaju po 45 ml steriliziranoga

---

<sup>1</sup> Carl von Linné (\* 23. svibnja 1707. u Råshultu/Älmhultu; † 10. siječnja 1778. u Uppsali).

modificiranog Andrewsova medija i začepljene su jednostavnim čepovima za epruvete. U svaku ispitnu komoru stavlja se samo jedan biljni segment. Na posude za uzgoj kultura nanosi se laboratorijski film za brtvljenje. Kad se uspostavi sterilna kultura, biljne segmente koji sadržavaju više nodija treba prenositi u nove ispitne komore sa svježim tekućim hranjivim medijima svakih deset do dvanaest dana. Biljke moraju biti sterilne, što se dokazuje uzgojem kultura na agarim podlogama, i ostati sterilne osam tjedana prije početka ispitivanja.”

Budući da modificirani Andrewsov medij sadržava saharozu (koja potiče rast gljivica i bakterija), potrebni su sterilni uvjeti za pripremu materijala, držanje otopina i uzgoj kultura. Sve tekućine i oprema steriliziraju se prije upotrebe. Sterilizacija se provodi tretiranjem zagrijanim zrakom (210 °C) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na 121 °C. Usto, sve tikvice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

Osnovne se kulture mogu držati na slabijoj svjetlosti i nižoj temperaturi ( $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) duže vrijeme bez premještanja. Uzgojni medij za krocanj trebao bi biti isti kao onaj koji se upotrebljava za ispitivanje, ali i drugi mediji bogati hranjivim tvarima mogu se upotrebljavati za osnovne kulture.

Biljni segmenti raspoređuju se aksenično u nekoliko Erlenmeyerovih tikvica od 500 ml ili/i Fernbachovih tikvica od 2 000 ml, od kojih je svaka napunjena s približno 450 odnosno 1 000 ml modificiranog Andrewsova medija. Zatim se tikvice zatvaraju aksenično celuloznim čepom.

Osim toga, apsolutno je nužno temeljito tretirati opremu plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe. Biljke treba prenositi u svježu hranjivu otopinu otprilike svaka tri tjedna, ovisno o njihovom broju i njihovoj veličini.

Za tu obnovljenu kulturu mogu se upotrebljavati i apeksi i segmenti srednjeg dijela stabljike. Broj i veličina biljaka (ili segmenata biljaka) koje se prenose ovise o tome koliko je biljaka potrebno. Na primjer, može se prenijeti pet dijelova izdanka u Fernbachovu tikvicu, a tri dijela u Erlenmeyerovu tikvicu; svaki je dio dug 5 cm. Odbacuju se svi dijelovi s korijenima ili cvjetovima, mrtvi dijelovi te oni s neobičnim značajkama.



**Slika 1.** Rezanje biljaka za osnovnu kulturu i pretkulturu nakon tri tjedana uzgoja.

Kulture biljaka treba uzgajati u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 ml i Fernbachovim tikvicama od 2 000 ml u inkubatoru s hlađenjem na  $20 \pm 2$  °C sa stalnom svjetlošću od otprilike  $100 - 150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ili 6 000 – 9 000 lux (iz izvora sobne rasvjete boje „toplo bijelo svjetlo”).



**Slika 2.** Uzgoj biljaka u inkubatoru s hlađenjem sa sobnom rasvjetom.

**Upotrebljavaju se kemijski čiste (kiselinom očišćene) i sterilne staklene uzgojne posude, a pri rukovanju se primjenjuju aseptički postupci. U slučaju onečišćenja osnovne kulture npr. algama, gljivicama i/ili bakterijama, treba pripremiti novu kulturu ili upotrijebiti osnovnu kulturu iz drugog laboratorija za obnovu kulture.**

#### Dodatak 4.

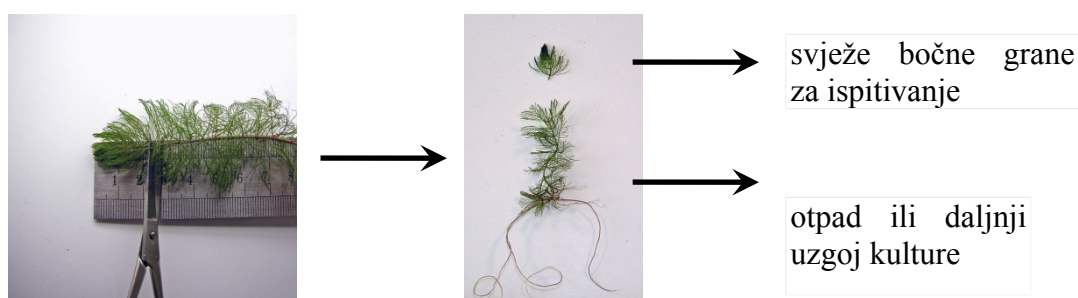
### DRŽANJE PRETKULTURE I PRIPREMA ORGANIZAMA ZA ISPITIVANJE

Za dobivanje pretkultura treba izrezati izdanke osnovne kulture u segmente od kojih svaki ima dva pršljena; segmenti se stavljaju u Fernbachove tikvice napunjene modificiranim Andrewsovim medijem (s 3 % saharoze). Svaka tikvica može sadržavati do 50 segmenata izdanka. Ipak, treba paziti da su segmenti vitalni i da nemaju korijenje ni bočne grane ili njihove pupoljke (vidjeti sliku 1. u Dodatku 3.).

Organizmi pretkulture uzgajaju se 14 dana – 21 dan u sterilnim uvjetima u komori s izmjeničnim fazama svjetlost/tama od 16/8 sati. Intenzitet svjetlosti odabire se u rasponu  $100 - 150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Budući da modificirani Andrewsov medij sadržava saharozu (koja potiče rast alga, gljivica i bakterija), potrebni su sterilni uvjeti za pripremu otopina ispitivane kemikalije i uzgoj kultura. Sve tekućine i oprema steriliziraju se prije upotrebe. Sterilizacija se provodi tretiranjem zagrijanim zrakom ( $210 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 4 sata ili tretiranjem u autoklavu 20 minuta na  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ . Usto, sve tikvice, zdjelice, zdjele i ostala oprema tretiraju se plamenom na sterilnoj radnoj površini neposredno prije upotrebe.

Izdanci se aksenično uklanjaju iz tikvica s pretkulturama, pri čemu se bira što homogeniji materijal. Za svako ispitivanje potrebno je najmanje 60 ispitnih organizama (ispitivanje s osam koncentracija ispitivane kemikalije). Za ispitivanje se uzimaju svježe bočne grane iz pretkultura, skraćuju se na 2,5 cm od baze (mjerjenje pomičnim mjerilom) i prenose u čašu sa sterilnim modificiranim Andrewsovim medijem. Te svježe bočne grane mogu se upotrijebiti za ispitivanje toksičnosti klasastog krocnja u sustavu bez sedimenta.



**Slika 2.** Rezanje biljaka iz pretkulture za ispitivanje toksičnosti na *Myriophyllum spicatum* u sustavu bez sedimenta.



## C.51. Ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu voda-sediment

### UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 239 (2014.). Dostupne su ispitne metode za plutajuće vodene jednosupnice iz roda *Lemna* (1.) i za alge (2.). Te se metode često primjenjuju za prikupljanje podataka o rizicima povezanim s ispitivanim kemikalijama, posebice kemikalijama herbicidnog djelovanja, na neciljane vrste vodenog bilja. Međutim, u nekim slučajevima mogu biti potrebni podaci za dodatne vrste makrofita. U smjernicama koje su nedavno objavljene kao rezultat radionice Društva za toksikologiju i kemiju okoliša (SETAC) o procjeni rizika od pesticida za vodene makrofite (AMRAP) navedeno je da za ispitivane kemikalije mogu biti potrebni podaci za ukorijenjenu makrofitnu vrstu ako je poznato da alge i vrste iz roda *Lemna* nisu osjetljive na način djelovanja predmetne kemikalije ili ako postoji mogućnost razdiobe u sedimentu koja bi dovela do izloženosti apsorpcijom kroz korijen (3.). Na temelju postojećeg znanja i iskustva *Myriophyllum* spp. odabrane su kao preferirana vrsta u slučajevima kada su potrebni podaci za podvodne ukorijenjene dvosupnice (4., 5., 6.). Ovo ispitivanje ne zamjenjuje druga ispitivanja toksičnosti u vodi, već bi im trebalo biti nadopuna radi cjelovitije procjene opasnosti i rizika za vodene biljke. Ispitivanjem toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu voda-sediment nadopunjuje se ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju u sustavu bez sedimenta (7.).
2. U ovom dokumentu opisuje se ispitna metoda kojom se mogu procijeniti učinci ispitivane kemikalije na ukorijenjenu vodenu biljnu vrstu klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu voda-sediment. Ispitna metoda djelomično se temelji na postojećim metodama (1., 2., 8.) i u njoj se uzimaju u obzir novija istraživanja povezana s procjenom rizika za vodene biljke (3.). Metoda voda-sediment validirana je međunarodnim međulaboratorijskim testom s vrstama krocnja koje su uzgojene u statičkim uvjetima te izložene ispitivanoj kemikaliji u vodenom stupcu (9.). Međutim, ispitni sustav lako se prilagođava za izlaganje u sedimentu s dodatkom ili izlaganje u vodenoj fazi u polustatičkom sustavu ili sustavu s pulsним doziranjem, iako te metode nisu formalno ispitane međulaboratorijskim testom. Nadalje, opća metoda može se primjenjivati i na druge ukorijenjene podvodne i nadvodne vrste, uključujući druge vrste krocnja (npr. *Myriophyllum aquaticum*) i veliku pirevinu (*Glyceria maxima*) (10.). Za druge vrste može biti potrebno izmijeniti ispitne uvjete, plan i trajanje ispitivanja. Posebno je potrebno dodatno utvrditi odgovarajuće postupke za *Myriophyllum aquaticum*. U ovoj ispitnoj metodi nisu navedene pojedinosti o tim drugim mogućnostima, nego se opisuje

standardni pristup za izlaganje *Myriophyllum spicatum* u statičkom sustavu u vodenoj fazi.

3. Ova ispitna metoda primjenjuje se na tvari za koje je ispitna metoda validirana (vidjeti pojedinosti u izvješću o međulaboratorijskom testu (9.)), formulacije ili poznate smjese. Ispitivanje na krocnju može se provesti kako bi se ispunio zahtjev za podatke osnovnog stupnja zbog potencijalne razdiobe u sedimentu ili problema povezanih s načinom djelovanja / selektivnošću ispitivane kemikalije. Laboratorijsko ispitivanje na krocnju može biti potrebno i kao dio višestupanjske strategije za preispitivanje mogućih rizika za vodene biljke. U skladu s konkretnim razlogom za provođenje ispitivanja odredit će se način izlaganja (u vodi ili sedimentu). Prije primjene ove ispitne metode za ispitivanje smjese namijenjeno u regulatornu svrhu trebalo bi razmotriti mogu li se tom metodom osigurati odgovarajući rezultati za tu svrhu, i zašto. Takva razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

## NAČELO ISPITIVANJA

4. Ispitivanje je namijenjeno ocjenjivanju učinaka kemikalija na vegetativni rast krocnja (*Myriophyllum*) u standardiziranim medijima (voda, sediment i hranjive tvari). U tu se svrhu vrhovi izdanaka zdravih biljaka bez cvjetova stavljaju u lonce za biljke sa standardiziranim umjetnim sedimentom kojemu se dodaju hranjive tvari kako bi se osigurao prikladan rast biljaka te se potom biljke drže u Smartovu i Barkovu mediju (Dodatak 1.). Nakon razdoblja potrebnog za formiranje korijena biljke se izlažu nizu ispitnih koncentracija u vodenom stupcu. Alternativno, može se simulirati izlaganje u sedimentu dodatkom ispitivane kemikalije umjetnom sedimentu i presađivanjem biljaka u taj sediment s dodatkom. U oba slučaja biljke se potom drže u kontroliranim okolnim uvjetima 14 dana. Učinci na rast određuju se na temelju kvantitativnih procjena duljine izdanka, svježe mase i suhe mase, kao i kvalitativnih zapažanja simptoma kao što su kloroza, nekroza ili deformacije pri rastu.
5. Da bi se kvantificirali učinci kemikalije, rast u ispitnim otopinama uspoređuje se s rastom kontrolnih biljaka te se određuje koncentracija koja uzrokuje određeni postotak ( $x\%$ ) inhibicije rasta i izražava se kao  $EC_x$ ; „ $x$ ” može biti bilo koja vrijednost, ovisno o regulatornim zahtjevima, npr.  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ . Treba napomenuti da su procjene  $EC_{10}$  i  $EC_{20}$  pouzdane i primjerene samo u ispitivanjima u kojima su koeficijenti varijacije za kontrolne biljke niži od razine učinka koji se procjenjuje, tj. za pouzdanu procjenu  $EC_{20}$  koeficijent varijacije trebao bi biti  $< 20\%$ .
6. Trebalo bi odrediti prosječnu specifičnu brzinu rasta (na temelju procjena duljine izdanka, svježe mase izdanka i suhe mase izdanka) i prirast (na temelju povećanja duljine izdanka,

svježe mase izdanka i suhe mase izdanka) netretiranih i tretiranih biljaka. Na temelju specifične brzine rasta ( $r$ ) i prirasta ( $y$ ) zatim se određuju  $E_r C_x$  (npr.  $E_r C_{10}$ ,  $E_r C_{20}$ ,  $E_r C_{50}$ ) odnosno  $E_y C_x$  (npr.  $E_y C_{10}$ ,  $E_y C_{20}$ ,  $E_y C_{50}$ ).

7. Ako je potrebno, mogu se statistički odrediti i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) na temelju procjena prosječnih specifičnih brzina rasta i prirasta.

## PODACI O ISPITIVANOJ KEMIKALIJI

8. Mora biti raspoloživa analitička metoda odgovarajuće osjetljivosti za kvantifikaciju kemikalija u ispitnom mediju.
9. Za određivanje ispitnih uvjeta korisno je imati podatke o ispitivanoj kemikaliji kao što su strukturna formula, sastav ako je riječ o tvari s više sastojaka, UVCB tvari, smjesi ili formulaciji, čistoća, topljivost u vodi, stabilnost u vodi i na svjetlosti, konstanta disocijacije kiseline ( $pK_a$ ), koeficijent razdjeljenja oktanol/voda ( $K_{ow}$ ), ako je dostupan  $K_d$  u sedimente, tlak pare i biorazgradivost. Topljivost u vodi i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, iz koje se može zaključiti mogu li se u razdoblju ispitivanja očekivati značajni gubitci ispitivane kemikalije. Ako se mogu očekivati gubitci ispitivane kemikalije, treba ih kvantificirati i naznačiti daljnje mjere za kontrolu takvih gubitaka. Ako podaci o topljivosti i stabilnosti ispitivane kemikalije / ispitivanih kemikalija nisu pouzdani, preporučuje se da se one procijene u uvjetima ispitivanja, tj. u uzgojnom mediju te pri temperaturi i osvjetljenju koji će se upotrebljavati tijekom ispitivanja. Napomena: kada se ispituju herbicidi koji izazivaju peroksidaciju ovisnu o svjetlosti, trebalo bi upotrebljavati laboratorijsku rasvjetu s jednakom količinom solarnog ultraljubičastog svjetla kao u prirodnoj sunčevoj svjetlosti.
10. pH-vrijednost treba mjeriti i prema potrebi prilagođavati u ispitnom mediju. Kontrola pH-vrijednosti ispitnog medija posebno je važna, npr. pri ispitivanju metala ili kemikalija koje su hidrolitički nestabilne. Dodatne smjernice za ispitivanje kemikalija čija fizikalno-kemijska svojstva otežavaju ispitivanje nalaze se u Smjernicama OECD-a (11.).

## VALJANOST ISPITIVANJA

11. Da bi rezultati ispitivanja bili valjani, srednja ukupna duljina izdanaka i srednja ukupna svježa masa izdanaka kontrolnih biljaka trebaju se najmanje udvostručiti u fazi izlaganja. Osim toga, na samim kontrolnim biljkama, na površini sedimenta i u ispitnom mediju ne smije biti vidljivih znakova kloroze ni onečišćenja drugim organizmima kao što su alge i/ili bakterijski filmovi.

12. Srednji koeficijent varijacije za prirast na temelju mjerenja svježe mase izdanka (od početka do kraja ispitivanja) u kontrolnim kulturama ne bi trebao prelaziti 35 % među ponovljenim uzorcima.

## REFERENTNA KEMIKALIJA

13. Referentnu kemikaliju (ili više njih), kao što je 3,5-diklorofenol, koji je upotrijebljen u međulaboratorijskom testu (9.), trebalo bi povremeno ispitati radi provjere uspješnosti ispitnog postupka. Prema podacima iz međulaboratorijskog testa srednje su vrijednosti  $EC_{50}$  3,5-diklorofenola za različite varijable odgovora između 4,7 i 6,1 mg/l (za pojedinosti o očekivanom intervalu pouzdanosti za te vrijednosti vidjeti izvješće o međulaboratorijskom testu). Preporučljivo je da se referentna kemikalija ispita barem dvaput godišnje ili, ako se ispitivanje provodi rjeđe, istovremeno s glavnim ispitivanjem toksičnosti. Vodič za očekivane vrijednosti  $EC_{50}$  3,5-diklorofenola dostupan je u statističkom izvješću o međunarodnome međulaboratorijskom testu (9.).

## OPIS METODE

### Ispitna oprema

14. Ispitivanje bi trebalo provoditi u kontroliranim okolnim uvjetima, tj. u uzgojnoj komori, prostoriji ili laboratoriju u kojoj/kojemu se mogu kontrolirati duljina dana, svjetlost i temperatura (vidjeti odjeljak „Ispitni uvjeti”, stavke 56. – 58). Osnovne kulture treba držati odvojeno od ispitnih posuda.
15. Za ispitivanje bi trebalo upotrebljavati staklene ispitne posude kao što su akvariji ili laboratorijske čaše; obično se upotrebljavaju staklene laboratorijske čaše od 2 l (približno 24 cm visoke i 11 cm u promjeru). Međutim, mogu biti prikladne i veće posude uz uvjet da je voda dovoljno duboka da biljke mogu neograničeno rasti i biti uronjene tijekom cijelog ispitivanja.
16. Biljke se mogu stavljati u sediment u plastičnim ili staklenim loncima za biljke (približno 9 cm u promjeru, visine 8 cm i volumena 500 ml). Umjesto lonaca mogu se upotrebljavati staklene čaše, koje i imaju prednost u nekim slučajevima (npr. ispitivanje hidrofobnih kemikalija ili kemikalija s visokim  $K_{ow}$ ).
17. Veličinu lonca/čaše treba odabrati u skladu s odabirom ispitnih posuda i plana ispitivanja (vidjeti dolje). Ako se primjenjuje plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi), vjerojatno će biti potrebni manji lonci ili veće posude. Ako se primjenjuje plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi), lonci i posude trebaju biti

odgovarajuće veličine. U svakom slučaju dubina vode trebala bi biti 12 cm iznad vrha sedimenta te bi trebalo zabilježiti omjer površine/volumena sedimenta i površine/volumena vode.

### Ispitni organizam

18. Opći pristupi opisani u ovoj ispitnoj metodi mogu se primijeniti za ispitivanje niza vodenih biljnih vrsta. Međutim, uvjeti izneseni u ovoj ispitnoj metodi prilagođeni su za ispitivanje vrste klasastog krocnja – *Myriophyllum spicatum*. Ta vrsta pripada porodici dvosupnica *Haloragaceae* (krocnji).
19. Klasasti krocanj (*Myriophyllum spicatum*) podvodna je ukorijenjena vrsta koja uspijeva u vrlo raznolikim uvjetima i nalazi se u vodama stajaćicama i tekućicama. Višegodišnja je biljka koja tijekom zime ugiba, ostaje samo korijen. Biljke obično slobodno cvjetaju i stvaraju sjemenke iako je vegetativno razmnožavanje s pomoću aksilarnih pupoljaka ili dijelova stabljike koji se odvoje prirodno ili zbog djelovanja na biljku često primarna metoda kolonizacije.

#### *Uzgoj kulture ispitnog organizma*

20. Biljke se mogu dobiti iz prirodnih populacija ili od dobavljača vodenih biljaka. U svakom slučaju treba dokumentirati podrijetlo biljaka i provjeriti identitet vrste. Pri prikupljanju klasastog krocnja u prirodi treba posebno pripaziti da se prikuplja odgovarajuća vrsta, posebno u regijama u kojima može hibridizirati s drugim vrstama krocnja (*Myriophyllum*). U slučaju dvojbe preporučuje se upotrebljavati provjerene laboratorijske kulture poznatog podrijetla. Biljke koji su bile izložene kemijskim kontaminantima ili su prikupljene iz područja za koje je poznato da su kontaminirana ne bi trebalo upotrebljavati u ovom ispitivanju.
21. U regijama gdje klasasti krocanj nije lako pronaći tijekom zimskih mjeseci može biti potrebno dugoročno držati osnovne kulture u stakleničkim ili laboratorijskim uvjetima. Osnovne kulture treba držati u uvjetima sličnima ispitnim uvjetima, iako se mogu smanjiti osvjetljenje i temperatura kako bi rjeđe bilo potrebno održavati kulture (npr. kad za određeno razdoblje nisu planirana ispitivanja na krocnju). Preporučuje se upotrebljavati akvarije i lonce za biljke veće od onih koji se namjeravaju upotrebljavati u ispitivanjima, kako bi bilo dovoljno prostora za širenje. Sastav sedimenta i vode trebao bi biti isti kao onaj koji se namjerava upotrebljavati u ispitivanjima, iako se mogu primijeniti i druge metode obogaćivanja sedimenta (npr. upotreba komercijalnih formulacija za postupno ispuštanje gnojiva).
22. Na osnovnim biljkama ne bi smjelo biti vidljivih znakova kontaminacije bilo kakvim drugim organizmima, uključujući puževe, vlaknaste alge, gljivice i insekte, npr. jajašca ili

ličinke noćnog leptira *Paraponyx stratiotata* i ličinke ili odrasle kukce pipe *Eubrychius velutus*. Može biti potrebno isprati biljni materijal u slatkoj vodi kako bi se uklonila vidljiva kontaminacija. Osim toga, trebalo bi nastojati minimizirati kontaminaciju jednostaničnim algama i bakterijama, iako biljni materijal ne mora biti potpuno sterilan. Osnovne kulture treba nadzirati i prema potrebi presađivati kako bi se izbjegla kontaminacija algama i bakterijama. Ako kontaminacija algama i bakterijama uzrokuje probleme, može pomoći prozračivanje osnovnih kultura.

23. U svakom slučaju biljke se uzgajaju/aklimatiziraju u uvjetima koji su slični, ali ne nužno jednaki uvjetima u ispitivanju tijekom odgovarajućeg razdoblja (tj. > 2 tjedna) prije njihove uporabe u ispitivanju.
24. Osnovne kulture u cvatu ne bi se trebale upotrebljavati u ispitivanju jer brzina vegetativnog rasta općenito pada tijekom i nakon cvjetanja.

### **Sediment**

25. U ovom ispitivanju preporučuje se upotrebljavati formulirani sediment opisan u nastavku koji se temelji na umjetnom sedimentu iz poglavlja C.28. ovog Priloga (8.). Sediment se priprema kako je opisano u ispitnoj metodi u C.28., osim što se dodaju hranjive tvari kako je opisano u nastavku:
  - a) 4 – 5 % (suhe mase) treseta (u skladu s  $2 \pm 0,5$  % organskog ugljika) što bliže pH-vrijednosti od 5,5 do 6,0; važno je da se upotrijebi treset u prahu, fino usitnjen (po mogućnosti veličine čestica < 1 mm) i sušen samo na zraku;
  - b) 20 % (suhe mase) kaolinske gline (sadržaj kaolinita po mogućnosti više od 30 %);
  - c) 75 – 76 % (suhe mase) kvarcnog pijeska (trebao bi prevladavati fini pijesak, s više od 50 % čestica između 50 i 200  $\mu\text{m}$ );
  - d) dodaje se hranjivi vodeni medij tako da konačna šarža sedimenta sadržava 200 mg amonijeva klorida i 200 mg natrijeva fosfata po kilogramu suhog sedimenta te da je udio vlage u konačnoj smjesi od 30 do 50 %;
  - e) dodaje se kalcijev karbonat kemijski čiste kvalitete ( $\text{CaCO}_3$ ) kako bi se pH-vrijednost konačne smjese sedimenta podesila na  $7,0 \pm 0,5$ .
26. Podrijetlo treseta, kaolinske gline i pijeska mora biti poznato i dokumentirano. Ako je podrijetlo nepoznato ili uzrokuje zabrinutost, treba provjeriti da dotične komponente nisu kemijski kontaminirane (npr. teškim metalima, organoklornim spojevima, organofosfornim spojevima).
27. Suhe sastojke sedimenta treba homogeno izmiješati te zatim temeljito umiješati hranjivu vodenu otopinu u sediment. Vlažni sediment trebalo bi pripremiti najmanje dva dana prije

upotrebe kako bi se omogućilo temeljito natapanje treseta i spriječilo plutanje njegovih hidrofobnih čestica na površini kada se sediment prekrije medijem; prije upotrebe vlažni se sediment može skladištiti u mraku.

28. Za ispitivanje sediment se prenosi u spremnike odgovarajuće veličine, na primjer u lonce za biljke promjera prikladnog za staklene posude (površina sedimenta trebala bi prekrivati približno 70 % ili više površine posude). Ako spremnik ima otvore na dnu, može se umetnuti komad filtera papira kako bi sediment ostao unutar spremnika. Lonci za biljke pune se sedimentom tako da površina sedimenta bude ravna, nakon čega se pokriva tankim slojem (~ 2 do 3 mm) inertnog materijala kao što je pijesak ili fini pijesak za hortikulturu (ili drobljeni koralj) kako bi sediment ostao na mjestu.

### **Ispitni medij**

29. Za uzgoj kulture klasastog krocnja i ispitivanje na njemu preporučuje se Smartov i Barkov medij (12.). Sastav tog medija naveden je u Dodatku 1. pH-vrijednost medija (vodena faza) na početku ispitivanja treba biti između 7,5 i 8,0 za optimalni rast biljaka.

### **Plan ispitivanja**

30. Za ispitivanje treba upotrijebiti najmanje šest ispitnih posuda kao ponovljenih uzoraka za netretiranu kontrolu i najmanje četiri ispitne posude kao ponovljene uzorke za svaku od najmanje pet koncentracija.
31. Ako nije potrebno odrediti NOEC, plan ispitivanja može se izmijeniti tako da se poveća broj koncentracija i smanji broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji.
32. Svaka ispitna posuda predstavlja ponovljeni uzorak s tri izdanka. Postoje dvije mogućnosti za uzgoj tri izdanka u svakoj ispitnoj posudi:
- plan ispitivanja A: jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi,
  - plan ispitivanja B: tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi,
  - drugačiji planovi ispitivanja s jednim izdankom u loncu po ispitnoj posudi prihvatljivi su uz uvjet da se broj ponovljenih uzoraka po potrebi prilagodi kako bi se ispunili potrebni kriteriji valjanosti.
33. Pojedinačne ispitne posude trebalo bi nasumično rasporediti u skupine za tretiranje. Ispitne posude treba nasumično rasporediti i po prostoru za ispitivanje kako bi se minimizirao utjecaj prostornih razlika u intenzitetu svjetlosti i temperaturi.

### **Koncentracije kemikalije i kontrolne skupine**

34. Koncentracije bi trebale slijediti geometrijski niz; faktor za koji se ispitne koncentracije razlikuju ne bi smio biti veći od 3,2. Prethodna saznanja o toksičnosti ispitivane kemikalije na temelju ispitivanja za utvrđivanje raspona mogu pomoći u odabiru prikladnih ispitnih koncentracija.
35. Da bi se pri određivanju  $EC_x$  osigurala primjerena razina pouzdanosti,  $EC_x$  mora biti između najviše i najniže ispitne koncentracije. Primjerice, ako se procjenjuje  $EC_{50}$ , najviša ispitna koncentracija trebala bi biti viša od  $EC_{50}$ . Ako je vrijednost  $EC_{50}$  izvan raspona ispitnih koncentracija, pripadajući intervali pouzdanosti bit će veliki i možda neće biti moguće ispravno ocijeniti statističku prikladnost modela. Upotrebom više ispitnih koncentracija poboljšat će se interval pouzdanosti za dobivenu vrijednost  $EC_x$ .
36. Za određivanje LOEC/NOEC (krajnja točka po izboru), najniža ispitna koncentracija mora biti dovoljno niska da se rast ne razlikuje značajno od rasta kontrolnih biljaka. Isto tako, najviša ispitna koncentracija trebala bi biti dovoljno visoka da rast bude znatno niži od rasta kontrolnih biljaka. Upotrebom više ponovljenih uzoraka poboljšat će se statistička pouzdanost najviše koncentracije bez učinka / analize varijance (ANOVA).

### **Ispitivanje granične koncentracije**

37. Kad ispitivanje za utvrđivanje raspona ukazuje na to da ispitivana kemikalija nema štetno djelovanje u koncentraciji do 100 mg/l ili do granice svoje topljivosti u ispitnom mediju, odnosno, ako je riječ o formulaciji, do granice disperzivnosti, može se provesti ispitivanje granične koncentracije kako bi se mogli usporediti odgovori kontrolne skupine s odgovorom jedne tretirane skupine (100 mg/l ili koncentracija koja odgovara granici topljivosti, ili 1 000 mg/kg suhog sedimenta). To ispitivanje treba provesti u skladu s općim načelima standardnog ispitivanja koncentracija-odgovor, s iznimkom da se savjetuje povećati minimalni broj ponovljenih uzoraka na šest ispitnih posuda po kontroli i koncentraciji. Rast u kontrolnoj i tretiranoj skupini može se analizirati statističkim testom za usporedbu srednjih vrijednosti, npr. Studentovim t-testom.

### **Ispitne otopine**

38. Ispitne otopine obično se pripremaju razrjeđivanjem matične otopine, koja se priprema otapanjem ili disperzijom ispitivane kemikalije u Smartovu i Barkovu mediju s demineraliziranom (tj. destiliranom ili deioniziranom) vodom (vidjeti Dodatak 1.).
39. Najviša ispitna koncentracija ne bi smjela biti veća od topljivosti ispitivane kemikalije ili, ako je riječ o formulaciji, njezine disperzivnosti u ispitnim uvjetima.
40. Za ispitivane kemikalije slabe topljivosti u vodi možda će biti potrebno pripremiti koncentriranu matičnu otopinu ili disperziju kemikalije upotrebljavajući organsko otapalo



ili dispergent kako bi se olakšalo dodavanje točnih količina ispitivane kemikalije u ispitni medij te ubrzalo njezinu disperziju i otapanje. Treba svakako nastojati izbjeći upotrebu takvih otapala ili dispergenata. Pomoćna otapala ili dispergenti koji se upotrijebe ne bi smjeli djelovati fitotoksično. Neka od otapala u širokoj uporabi koja nemaju fitotoksično djelovanje u koncentracijama do 100 µl/l su aceton i dimetilformamid. Ako se upotrebljava otapalo ili dispergent, treba navesti njegovu konačnu koncentraciju, koju treba svesti na najmanju moguću mjeru ( $\leq 100 \mu\text{l/l}$ ). U tim uvjetima sve tretirane skupine i kontrole (s otapalom) trebale bi sadržavati istu koncentraciju otapala odnosno dispergenta. Netretirani kontrolni ponovljeni uzorci koji ne sadržavaju otapalo ili dispergent također su uključeni u plan ispitivanja. Dodatne smjernice o upotrebi dispergenata dostupne su u Smjernicama OECD-a (11.).

## **ISPITNI POSTUPAK**

41. Ispitni postupak varira s obzirom na način primjene ispitivane kemikalije (u vodenoj ili sedimentnoj fazi). Pri odabiru načina izlaganja u ispitivanju (statički postupak ili statički postupak s obnavljanjem, voda s dodatkom ili sediment s dodatkom) trebalo bi razmotriti očekivano ponašanje ispitivane kemikalije u sustavu voda-sediment. Sediment s dodatkom ponekad može imati prednost za kemikalije za koje se očekuje znatna razdioba u sedimentu.

### **Faza uspostave kulture**

42. Od biljaka odabrane kulture odrežu se vrhovi zdravih izdanaka, tj. bez bočnih izdanaka, duljine 6 cm ( $\pm 1$  cm). Za plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi) u svaki lonac sadi se po jedan izdanak. Za plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi) u svaki lonac sa sedimentom sadi se po četiri do pet vrhova izdanka.
43. U oba slučaja potrebno je posaditi izdanke u više lonaca kako bi se na početku ispitivanja mogle odabrati jednolike biljke te kako bi bilo rezervnih biljaka koje se mogu upotrijebiti za pregled rasta korijena neposredno prije tretiranja i onih koje se mogu ubrati radi mjerenja biomase i duljine izdanka 0. dan.
44. Izdanci se sade tako da približno 3 cm, na kojima se nalaze najmanje dva nodija, budu ispod površine sedimenta.
45. Lonci se zatim prenose u ispitne posude u istim okolnim uvjetima kao za fazu izlaganja te se sedam dana drže u Smartovu i Barkovu mediju kako bi se počeo razvijati korijen.
46. Nakon tog razdoblja nekoliko se biljaka u rezervnim loncima uzima za pregled rasta korijena. Ako nije vidljiv rast korijena (tj. ne vide se vrhovi korijena), fazu uspostave

kulture treba produžiti dok ne bude vidljiv rast korijena. Taj se korak preporučuje kako bi se osiguralo da biljke aktivno rastu u vrijeme započinjanja ispitivanja.

### **Odabir jednolikog biljnog materijala**

47. Za plan ispitivanja A (jedan izdanak u loncu, tri lonca u posudi) jednoliki lonci biraju se prije započinjanja ispitivanja. Za plan ispitivanja B (tri izdanka u loncu, jedan lonac u posudi), suvišne se biljke uklanjaju kako bi ostale tri biljke jednake veličine i izgleda.

### **Izlaganje u vodenoj fazi**

48. Lonci s biljkama koji su odabrani zbog jednolikosti stavljaju se u ispitne posude kako je određeno u planu ispitivanja. Zatim se u ispitne posude dodaje Smartov i Barkov medij. Treba paziti da se izbjegne remećenje sedimenta. Zato se mediji mogu dodavati koristeći se lijevkom ili plastičnim diskom za pokrivanje sedimenta dok se medij ulijeva u ispitne posude, uz uvjet da se disk ukloni odmah nakon toga. Biljni lonci mogu se staviti u ispitne posude i nakon dodavanja medija. U oba slučaja svježi mediji mogu se upotrebljavati na početku faze izlaganja, ako je potrebno, kako bi se smanjilo potencijalno gomilanje algi i bakterija ili omogućila priprema jedinstvenih šarži ispitne otopine među ponovljenim uzorcima.
49. Prije ili nakon dodavanja medija mjeri se duljina izdanka iznad sedimenta.
50. Odgovarajuća količina ispitivane kemikalije može se dodati u ispitni medij prije nego se on doda u ispitne posude. Ispitivana kemikalija može se dodati u medij i nakon što je on dodan u ispitne posude. U tom slučaju treba paziti da se ispitivana kemikalija jednoliko rasporedi u cijelom ispitnom sustavu bez remećenja sedimenta.
51. U svakom slučaju na početku ispitivanja bilježi se izgled ispitnog medija (npr. jasan, mutan itd.).

### **Izlaganje u sedimentu**

52. Sedimenti s dodatkom odabrane koncentracije pripremaju se dodavanjem otopine ispitivane kemikalije izravno u svježi sediment. Matična otopina ispitivane kemikalije otopljena u deioniziranoj vodi miješa se s formuliranim sedimentom valjkastim mlinom, miješalicom hrane ili ručnim miješanjem. Ako je ispitivana kemikalija slabo topljiva u vodi, može se otopiti u što je moguće manjem volumenu prikladnog organskog otapala (npr. heksan, aceton ili kloroform). Ta se otopina potom miješa s otprilike 10 g finog kvarcnog pijeska po jednoj ispitnoj posudi. Otapalo se pusti da ispari, a pijesak se zatim miješa s prikladnom količinom sedimenta po ispitnoj laboratorijskoj čaši. Samo lako hlapljiva sredstva mogu se upotrebljavati za otapanje, dispergiranje ili emulgiranje

ispitivane kemikalije. Treba imati na umu da se u završnoj fazi pripreme sedimenta mora uzeti u obzir volumen/masa pijeska s dodatkom ispitivane kemikalije (sediment stoga treba pripremiti s manje pijeska). Treba paziti da ispitivana kemikalija koja se dodaje u sediment bude temeljito i ravnomjerno raspoređena u njemu.

53. Sediment s dodatkom stavlja se u lonce (kako je opisano). Biljke odabrane zbog jednolikosti i odgovarajućeg sustava korijenja vade se iz lonaca kojima se koristilo u fazi uspostave kulture i presađuju u sediment s dodatkom kako je opisano.
54. Lonci s biljkama stavljaju se u ispitne posude kako je određeno u planu ispitivanja. Zatim se u ispitne posude dodaje Smartov i Barkov medij, oprezno (s pomoću lijevka) kako bi se izbjeglo remećenje sedimenta. Prije ili nakon dodavanja medija mjeri se duljina izdanka iznad sedimenta.

### **Održavanje razine vode tijekom ispitivanja**

55. Mora se zabilježiti konačni volumen vode i označiti razina vode na svakoj ispitnoj posudi. Ako tijekom ispitivanja voda ispari za više od 10 %, trebalo bi nadomjestiti razinu vode destiliranom vodom. Ako je potrebno, laboratorijske se čaše mogu lagano pokriti prozirnim pokrovom, npr. prozirnim plastičnim poklopcima, kako bi se smanjilo isparavanje i kontaminacija sporama algi.

### **Ispitni uvjeti**

56. Upotrebljava se toplo ili hladno bijelo fluorescentno svjetlo za osvjetljenje od otprilike  $140 (\pm 20) \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  izmjereno kao fotosintetski aktivno zračenje (400 – 700 nm) na površini vode te u ciklusu svjetlost-tama od 16 : 8 h. Odstupanja od odabranog osvjetljenja u ispitnom prostoru ne bi smjela biti veća od  $\pm 15 \%$ .
57. Temperatura u ispitnim posudama trebala bi biti  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .
58. pH-vrijednost kontrolnog medija tijekom ispitivanja ne bi se smjela povećati za više od 1,5 jedinica. Ipak, zbog odstupanja za više od 1,5 jedinica ne dovodi se u pitanje valjanost ispitivanja ako se može dokazati da su zadovoljeni navedeni kriteriji valjanosti.

### **Trajanje ispitivanja**

59. Razdoblje izlaganja traje 14 dana.

### **Mjerenja i analitička određivanja**

60. Nakon faze uspostave kulture i neposredno prije tretiranja (tj. 0. dan) rezervne biljke iz pet nasumično odabranih lonaca za plan s tri biljke u loncu ili 15 lonaca za plan s jednom

biljkom u loncu izdvajaju se za procjenu duljine izdanka i svježe i suhe mase kako je opisano u nastavku.

61. Za biljke koje se prenose u fazu izlaganja provode se sljedeće procjene, kako je prikazano u tablici 1.:

- duljina glavnog izdanka, broj bočnih izdanaka i duljina bočnih izdanaka bilježe se barem na kraju razdoblja izlaganja (14. dan),
- vizualne procjene zdravlja biljke bilježe se najmanje tri puta tijekom razdoblja izlaganja (npr. 0., 7. i 14. dan),
- procjene svježe i suhe mase izdanaka provode se na kraju ispitivanja (14. dan).

62. Duljina izdanka mjeri se pomičnim mjerilom. Ako ima bočnih izdanaka potrebno je utvrditi njihov broj i duljinu.

63. Pri vizualnim procjenama zdravlja biljaka bilježe se izgled biljaka i opće stanje ispitnog medija. Zapažanja koja je potrebno zabilježiti uključuju:

- nekrozu, klorozu i druge promjene boje, npr. pretjerano crvenilo u odnosu na kontrolne biljke,
- kontaminaciju bakterijama ili algama,
- anomalije rasta kao što su zaostajanje u rastu, promjene duljine između nodija, deformacije izdanaka/listova, umnožavanje bočnih izdanaka, gubitak listova, gubitak turgora i fragmentacija stabljike,
- zdravlje korijena procjenjuje se vizualno na kraju ispitivanja uz pažljivo ispiranje sedimenta s korijena kako bi se mogao promatrati sustav korijena. U nastavku je prijedlog ljestvice za procjenu u odnosu na kontrolne biljke:

1. nema korijena
2. malo korijena
3. srednje razvijen korijen
4. vrlo dobro razvijen korijen, slično kontrolnim biljkama.

64. Svježa masa procjenjuje se na početku i kraju ispitivanja; izdanak se odreže na razini sedimenta i suši upijajućim materijalom prije vaganja. Treba paziti da se uklone čestice

sedimenta koje mogu prionuti uz dno izdanka. Izdanak se zatim stavi u sušionik na otprilike 60 °C i suši do konstantne mase, a zatim se ponovno važe i bilježi se suha masa.

65. U tablici 1. prikazane su minimalne biološke procjene koje je potrebno provesti tijekom ispitivanja.

**Tablica 1.** Plan procjena

Dan nakon tretiranja	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Duljina izdanka, duljina i broj bočnih izdanaka	Vizualne procjene izdanaka	Svježa i suha masa izdanka, vizualna procjena korijenja	pH O <sub>2</sub>
0	P	P	P	P
4	–	–	–	–
7	–	P	–	P
14	P	P	P	P

P znači da su tada potrebne procjene  
– znači da nisu potrebna mjerenja

*Učestalost mjerenja i analitičkih određivanja*

66. Najmanje jedanput dnevno (ili neprekidno, s pomoću uređaja za automatsko bilježenje podataka) treba bilježiti temperaturu medija u dodatnoj posudi koja se drži u istim uvjetima u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji.

67. pH ispitnog medija i koncentraciju u njemu otopljenog kisika treba provjeriti na početku ispitivanja, najmanje jedanput tijekom ispitivanja te na kraju u svim posudama kao ponovljenim uzorcima. Mjerenja bi trebalo provoditi uvijek u isto vrijeme dana. Ako se jedna otopina upotrebljava za pripremu svih ponovljenih uzoraka pojedinih ispitnih koncentracija, dovoljno je jedno mjerenje za svaku takvu otopinu 0. dan.

68. Osvjetljenje bi trebalo mjeriti u uzgojnoj komori, inkubatoru odnosno prostoriji u točkama jednakima razini površine vode. Mjerenja bi trebalo provesti najmanje jedanput na početku ispitivanja ili tijekom ispitivanja. Metoda detekcije i mjerenja svjetlosti, posebno vrsta senzora, utjecat će na izmjerenu vrijednost. Sferičnim sensorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad i ispod mjerne ravnine) i „kosinusnim” sensorima (koji reagiraju na svjetlost iz svih kutova iznad mjerne ravnine) daje se prednost u odnosu na usmjerene senzore jer bolje mjere vrijednosti za višetočasti izvor svjetlosti kakav je ovdje opisan.

*Analitička mjerenja ispitivane kemikalije*

69. Pravilna primjena ispitivane kemikalije trebala bi biti potkrijepljena analitičkim mjerenjima koncentracija ispitivane kemikalije.
70. Uzorke vode za analizu ispitivane kemikalije trebalo bi prikupiti ubrzo nakon početka ispitivanja (tj. na dan primjene za stabilne ispitivane kemikalije ili jedan sat nakon primjene za kemikalije koje nisu stabilne) i na kraju ispitivanja za sve ispitne koncentracije.
71. Koncentracije u sedimentu i pornoj vodi sedimenta trebalo bi odrediti na početku ispitivanja i na kraju ispitivanja, barem u najvišoj ispitnoj koncentraciji, osim ako je poznato da su ispitivane kemikalije stabilne u vodi (> 80 % nazivne koncentracije). Možda neće biti potrebno provoditi mjerenja u sedimentu i pornoj vodi ako je razdioba ispitivane kemikalije između vode i sedimenta jasno određena u ispitivanju vode/sedimenta u sličnim uvjetima (npr. omjer sedimenta i vode, način uvođenja kemikalije, vrsta sedimenta).
72. Uzorkovanje sedimenta na početku ispitivanja vjerojatno bi negativno utjecalo na ispitni sustav. Stoga mogu biti potrebne dodatne tretirane ispitne posude kako bi se olakšala analitička određivanja na početku i kraju ispitivanja. Slično tomu, ako se smatra da su potrebne procjene na polovici razdoblja ispitivanja, tj. 7. dan, a za analize su potrebni veliki uzorci sedimenta koji se ne mogu lako uzeti iz ispitnog sustava, analitička određivanja trebalo bi provoditi s pomoću dodatnih ispitnih posuda koje su tretirane na isti način kao posude kojima se koristi za biološke procjene.
73. Za izoliranje međuprostorne vode preporučuje se centrifugiranje na, primjerice, 10 000 g i 4 °C 30 minuta. Međutim, ako je dokazano da se ispitana kemikalija ne apsorbira na filtre, prihvatljivo je i filtriranje. U nekim slučajevima možda neće biti moguće analizirati koncentracije u pornoj vodi ako je uzorak premalen.
74. U polustatičkim ispitivanjima (izloženost u vodenoj fazi) kada se očekuje da koncentracija ispitivane kemikalije / ispitivanih kemikalija neće ostati u granicama od 20 % nazivne koncentracije tijekom razdoblja ispitivanja bez obnavljanja ispitnih otopina, trebalo bi pri svakom obnavljanju uzorkovati i upotrijebljene i svježije pripremljene ispitne otopine za analize koncentracije ispitivane kemikalije.
75. Za ispitivanja u kojima izmjerena početna koncentracija ispitivane kemikalije nije u granicama od 20 % nazivne koncentracije, ali ima dovoljno dokaza da su početne koncentracije ponovljive i stabilne (tj. unutar raspona od 80 do 120 % početne koncentracije), kemijska se određivanja mogu provoditi samo na najvišoj i najnižoj ispitnoj koncentraciji.

76. U svakom slučaju određivanje koncentracija ispitivane kemikalije potrebno je provesti samo na jednoj posudi po ispitnoj koncentraciji. Druga je mogućnost za analizu objediniti ispitne otopine svih ponovljenih uzoraka za svaku koncentraciju.
77. Ako se može dokazati da se koncentracija ispitivane kemikalije tijekom cijelog ispitivanja održavala u granicama od 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije, analiza rezultata i naknadno izvođenje krajnjih točaka mogu se temeljiti na nazivnim ili izmjerenim početnim vrijednostima.
78. U tim slučajevima koncentracije s učinkom trebale bi se temeljiti na nazivnim ili izmjerenim koncentracijama vode na početku ispitivanja.
79. Međutim, ako postoji dokaz da je koncentracija padala (tj. nije se održavala u granicama od 20 % nazivne ili izmjerene početne koncentracije u tretiranom prostoru) tijekom ispitivanja, analiza rezultata trebala bi se temeljiti na srednjoj geometrijskoj koncentraciji tijekom izlaganja ili modelima kojima se opisuje pad koncentracije ispitivane kemikalije u tretiranom prostoru (11.).

## PROCJENA PODATAKA

80. Kada je potrebno upotrijebiti otapalo ili dispergent, podaci iz kontrola s otapalom i netretiranih kontrola mogu se objediniti radi statističke analize, uz uvjet da odgovori kontrola s otapalom i netretiranih kontrola nisu statistički značajno različiti.

### Varijable odgovora

81. Svrha je ispitivanja odrediti učinke ispitivane kemikalije na vegetativni rast ispitne vrste s pomoću dvije varijable odgovora, prosječne specifične brzine rasta i prirasta, kako slijedi:

*Prosječna specifična brzina rasta*

82. Ta varijabla odgovora temelji se na promjenama logaritama ukupne duljine izdanka, ukupne svježe mase i ukupne suhe mase izdanka tijekom vremena u kontrolama i svim tretiranim skupinama. Izračunava se za svaki ponovljeni uzorak svake kontrolne i tretirane skupine. Za svaki ponovljeni uzorak treba izračunati srednju duljinu i masu triju biljaka po ispitnoj posudi (ponovljenom uzorku) te zatim brzinu rasta primjenom sljedeće formule:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

pri čemu je:

$\mu_{i-j}$ : prosječna specifična brzina rasta od vremena i do vremena j  
 $N_i$ : mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu i  
 $N_j$ : mjerna varijabla u ispitnoj ili kontrolnoj posudi u vremenu j  
 t: vremensko razdoblje od i do j

83. U skladu s odgovorima ponovljenih uzoraka treba izračunati srednju vrijednost brzine rasta s procjenama varijance za svaku tretiranu i kontrolnu skupinu.
84. Prosječnu specifičnu brzinu rasta treba izračunati za čitavo razdoblje ispitivanja (vrijeme „i” u navedenoj formuli označava početak ispitivanja, a vrijeme „j” kraj ispitivanja). Za svaku ispitnu koncentraciju i kontrolu treba izračunati srednju vrijednost prosječne specifične brzine rasta te procjene varijance.
85. Postotak inhibicije brzine rasta ( $I_r$ ) tada se može izračunati za svaku ispitnu koncentraciju (tretiranu skupinu) prema sljedećoj formuli:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

pri čemu je:

%  $I_r$ : postotak inhibicije prosječne specifične brzine rasta

$\mu_C$ : srednja vrijednost  $\mu$  u kontroli

$\mu_T$ : srednja vrijednost  $\mu$  u tretiranoj skupini

#### *Prirast*

86. Ta varijabla odgovora temelji se na promjenama ukupne duljine izdanka, ukupne svježe mase i ukupne suhe mase izdanka tijekom vremena u kontrolama i svim tretiranim skupinama. Srednji postotak inhibicije prirasta (%  $I_y$ ) za svaku tretiranu skupinu može se izračunati kako slijedi:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

pri čemu je:

%  $I_y$ : postotak smanjenja prirasta

$b_C$ : konačna biomasa u kontrolnoj skupini umanjena za početnu biomasu

$b_T$ : konačna biomasa u tretiranoj skupini umanjena za početnu biomasu

#### **Prikaz krivulja koncentracija-odgovor**



87. Treba izraditi krivulje koncentracija-odgovor kao prikaz odnosa srednje vrijednosti postotka inhibicije varijable odgovora ( $I_r$  ili  $I_y$ ), izračunanog kako je opisano, i logaritma koncentracije ispitivane kemikalije.

### Procjena $EC_x$

88. Procjene  $EC_x$  (npr.  $EC_{50}$ ) trebale bi se temeljiti i na prosječnoj specifičnoj brzini rasta ( $E_rC_x$ ) i na prirastu ( $E_yC_x$ ), a svaka od njih bi se pak trebala temeljiti na ukupnoj svježoj masi izdanka, ukupnoj suhoj masi izdanka te ukupnoj duljini izdanka.
89. Treba napomenuti da vrijednosti  $EC_x$  izračunane primjenom tih dviju varijabli odgovora nisu usporedive i tu razliku treba uzeti u obzir pri korištenju rezultatima ispitivanja. Uz poštovanje ispitnih uvjeta ove ispitne metode, vrijednosti  $EC_x$  na temelju prosječne specifične brzine rasta ( $E_rC_x$ ) u većini će slučajeva biti više od rezultata na temelju prirasta ( $E_yC_x$ ) zbog razlike u matematičkoj osnovi tih dvaju pristupa. Tu razliku ne treba tumačiti kao razliku u osjetljivosti tih dviju varijabli odgovora; jednostavno je riječ o matematički različitim vrijednostima.

### Statistički postupci

90. Cilj je regresijskom analizom dobiti kvantitativan odnos koncentracija-odgovor. Ako se provede linearizacijska transformacija podataka odgovora, npr. u jedinice probit, logit ili Weibullova modela (13.), može se provesti ponderirana linearna regresija; ipak, prednost se daje postupcima nelinearne regresije kojima se bolje rješavaju neizbježne nepravilnosti podataka i odstupanja od pravilnih distribucija. S približavanjem izostanku inhibicije ili potpunoj inhibiciji te se nepravilnosti transformacijom mogu i dodatno povećati te tako otežati analizu (13.). Treba napomenuti da su standardne metode analize za vrijednosti probit, logit ili Weibull namijenjene kvantalnim podacima (npr. smrtnost ili preživljavanje) i moraju se posebno prilagoditi da bi se mogle primijeniti na podatke o brzini rasta i prirastu. Konkretni postupci za određivanje vrijednosti  $EC_x$  iz kontinuiranih podataka mogu se pronaći u literaturi (14., 15., 16. i 17.).
91. Za svaku varijablu odgovora koja se analizira treba izračunati procjene vrijednosti  $EC_x$  na temelju odnosa koncentracija-odgovor. Za svaku procjenu određuju se granice pouzdanosti od 95 %, a valjanost podudaranja podataka odgovora s regresijskim modelom trebalo bi procijeniti grafički ili statistički. Regresijsku analizu trebalo bi provesti na temelju odgovora pojedinačnih ponovljenih uzoraka, a ne na temelju srednjih vrijednosti tretiranih skupina.
92. Ako raspoloživi regresijski modeli / regresijske metode nisu prikladni/-e za te podatke, procjene  $EC_{50}$  i granice pouzdanosti mogu se dobiti i linearnom interpolacijom sa samonadopunjavanjem („bootstrapping”) (18.).

93. Za procjenu LOEC-a, a time i NOEC-a, potrebno je usporediti srednje vrijednosti tretiranih skupina primjenom tehnika analize varijance (ANOVA). Zatim srednju vrijednost za svaku koncentraciju treba usporediti sa srednjom vrijednošću kontrole primjenom odgovarajućeg testa (npr. Dunnettov ili Williamsov test) (19., 20., 21., 22.). Treba provjeriti vrijedi li pretpostavka normalne distribucije i homogenosti varijanci ANOVA-e. To bi trebalo provjeriti Shapiro-Wilksovim testom (normalna razdioba) ili Leveneovim testom (homogenost varijanci). Ako pretpostavka normalne razdiobe i homogenosti varijanci nije ispunjena, to se ponekad može ispraviti logaritamskom transformacijom podataka. Ako je heterogenost varijanci i/ili devijacija od normalne razdiobe prevelika i ne može se ispraviti transformacijom, treba razmotriti mogućnost analize metodama kao što su Bonferroni-Welchov t-test, Jonckheere-Terpstrin „step-down” test i Bonferronijev test jednakovrijednosti medijana. Dodatne smjernice za određivanje NOEC-a mogu se pronaći u literaturi (16.).

## IZVJEŠĆIVANJE

94. Izvješće o ispitivanju treba obuhvaćati sljedeće podatke:

### *Ispitivana kemikalija*

tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- podaci za kemijsku identifikaciju tvari, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, oznaka SMILES ili InChI, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je praktički izvedivo itd.,

tvar s više sastojaka, tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal (UVCB tvar) ili smjesa:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativni udio i relevantna fizikalno-kemijska svojstva sastojaka.

### *Ispitne vrste*

- znanstveni naziv i podrijetlo.

### *Ispitni uvjeti*

- trajanje i uvjeti faze uspostave kulture,

- ispitni postupak (statički, polustatički, s pulsним doziranjem),
- datum početka i trajanje ispitivanja,
- ispitni medij, tj. sediment i tekući hranjivi medij,
  - opis plana ispitivanja: komora/prostorija za uzgoj ili laboratorij, ispitne posude i pokrovi, količine otopina, duljina i masa ispitnih biljaka po ispitnoj posudi na početku ispitivanja, omjer površine sedimenta i površine vode, omjer volumena sedimenta i vode,
  - ispitne koncentracije (nazivne odnosno izmjerene, prema potrebi) i broj ponovljenih uzoraka po koncentraciji,
  - način pripreme matičnih i ispitnih otopina, uključujući eventualnu upotrebu otapala ili dispergenata,
  - temperatura tijekom ispitivanja,
  - izvor svjetlosti, osvjetljenje ( $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ),
  - pH-vrijednosti ispitnih i kontrolnih medija te izgled ispitnih medija na početku i na kraju ispitivanja,
  - koncentracije kisika,
  - metoda analize s odgovarajućim podacima za procjenu kvalitete (validacijske studije, standardne devijacije ili granice pouzdanosti analiza),
  - metode određivanja mjernih varijabli, npr. duljine, suhe mase, svježe mase,
  - sva odstupanja od ove ispitne metode.

### *Rezultati*

- neobrađeni podaci: duljina izdanaka i masa izdanaka pojedinih biljaka / svih biljaka u pojedinom loncu i druge mjerne varijable u svakoj ispitnoj i kontrolnoj posudi pri svakom promatranju i analizi u skladu s planom procjena iz tablice 1.,
- srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku mjernu varijablu,
- krivulje rasta za svaku koncentraciju,

- vrijeme udvostručenja / brzina rasta u kontroli na temelju duljine i svježe mase izdanka, uključujući koeficijent varijacije za prirast svježe mase,
- izračunane varijable odgovora za svaki tretirani ponovljeni uzorak, uključujući srednje vrijednosti i koeficijente varijacije za ponovljene uzorke,
- grafički prikaz odnosa koncentracija-učinak,
- procjene toksičnih krajnjih točaka za varijable odgovora, npr.  $EC_{50}$ , i povezani intervali pouzdanosti, ako se izračunavaju LOEC i/ili NOEC, njihove vrijednosti i statističke metode koje su upotrijebljene za izračun,
- ako se primjenjuje ANOVA, jačina učinka koji se može utvrditi (npr. najmanja značajna razlika),
- svaka stimulacija rasta u bilo kojoj tretiranoj skupini,
- svi vidljivi znakovi fitotoksičnosti i zapažanja u ispitnim otopinama,
- rasprava o rezultatima, uključujući i sve utjecaje na rezultate ispitivanja nastale uslijed odstupanja od ove ispitne metode.

## LITERATURA

17. Poglavlje C.26. ovog Priloga: Test inhibicije rasta *Lemna* sp.
18. Poglavlje C.3. ovog Priloga: Test inhibicije rasta slatkovodnih algi i cijanobakterija.
19. Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14. – 16. siječnja 2008.
20. Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, str. 199-206.
21. ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.
22. Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, str. 715-722.
23. Poglavlje C.50. ovog Priloga: Ispitivanje toksičnosti na klasastom krocnju (*Myriophyllum spicatum*) u sustavu bez sedimenta.
24. Poglavlje C.28. ovog Priloga: Test toksičnosti trzalaca (*Chironomidae*) u vodi iz sedimenta s vodom obrađenom spikingom.
25. Ratte, M., H. Ratte (2014), “Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.
26. Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, str. 231-237.
27. OECD (2000), “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

28. Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, *Aquatic Botany*, Vol. 21/3, str. 251-263.
29. Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science Technology*, Vol. 18/9, str. 713-718.
30. Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, str. 157-167.
31. Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, 1485-1494.
32. OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
33. Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, str. 93-96.
34. Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
35. Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, str. 1096-1121.
36. Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, str. 482-491.
37. Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, str. 103-117.
38. Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, str. 519-531.

### Dodatak 1.

#### SASTAV SMARTOVA I BARKOVA MEDIJA

Sastojak	Količina reagensa koji se dodaje u vodu* (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
$\text{NaHCO}_3$	58,4
$\text{KHCO}_3$	15,4
pH (po uspostavljanju ravnoteže sa zrakom)	7,9

\* demineralizirana (tj. destilirana ili deionizirana) voda

## Dodatak 2.

### DEFINICIJE

**Biomasa** je svježa i/ili suha masa žive tvari u populaciji. U ovom ispitivanju biomasa je zbroj glavnog izdanka, svih bočnih grana i svog korijenja.

**Kemikalija** je tvar ili smjesa.

**Kloroza** je promjena zelene boje ispitnog organizma, posebno pršljena, u žućkastu.

**EC<sub>x</sub>** je koncentracija ispitivane kemikalije otopljene u ispitnom mediju koja uzrokuje smanjenje rasta klasastog krocnja od x % (npr. 50 %) u određenom razdoblju izlaganja (koje treba posebno navesti ako nije jednako cijelom ili uobičajenom vremenu trajanja ispitivanja). Da bi se jasno pokazalo je li vrijednost EC dobivena na temelju brzine rasta ili na temelju prirasta, upotrebljavaju se simboli „E<sub>r</sub>C” za brzinu rasta (*growth rate*) i „E<sub>y</sub>C” za prirast (*yield*), te se uz njih navodi mjerna varijabla koja je upotrijebljena, npr. E<sub>r</sub>C (duljina glavnog izdanka).

**Rast** je povećanje mjerne varijable, npr. duljine glavnog izdanka, ukupne duljine bočnih grana, ukupne duljine izdanka, ukupne duljine korijenja, svježe mase, suhe mase ili broja pršljena, tijekom razdoblja ispitivanja.

**Brzina rasta** (prosječna specifična brzina rasta) logaritamsko je povećanje mjerne varijable tijekom razdoblja izlaganja. Napomena: varijable odgovora povezane s brzinom rasta neovisne su o trajanju ispitivanja sve dok je rast neizloženih kontrolnih organizama eksponencijalan.

**Najniža koncentracija s vidljivim učinkom** (LOEC – *lowest observed effect concentration*) najniža je ispitana koncentracija kemikalije pri kojoj je uočen statistički značajan učinak smanjenja rasta (pri  $p < 0,05$ ) u usporedbi s kontrolom u određenom razdoblju izlaganja. Ipak, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati štetan učinak jednak onomu koji je zabilježen pri LOEC-u ili veći od njega. Ako ta dva uvjeta nisu ispunjena, treba detaljno obrazložiti kako je odabran LOEC (a prema tome i NOEC).



**Mjerna varijabla** je bilo koja varijabla koja se mjeri kako bi se izrazila krajnja točka ispitivanja s pomoću jedne varijable odgovora ili više različitih varijabli odgovora. U ovoj ispitnoj metodi mjerne varijable su duljina glavnog izdanka, ukupna duljina bočnih grana, ukupna duljina izdanka, ukupna duljina korijena, svježa masa, suha masa i broj pršljena.

**Monokultura** je kultura jedne biljne vrste.

**Nekroza** je mrtvo (tj. bijelo ili tamno smeđe) tkivo ispitnog organizma.

**Najviša koncentracija bez vidljivog učinka** (NOEC – *no observed effect concentration*) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a.

**Varijabla odgovora** je varijabla za procjenu toksičnosti izvedena iz bilo koje mjerene varijable koja opisuje biomasu primjenom različitih metoda izračuna. Za ovu ispitnu metodu brzina rasta i prirast su varijable odgovora izvedene iz mjernih varijabli kao što su duljina glavnog izdanka, ukupna duljina izdanka, svježa masa, suha masa ili broj pršljena.

**Polustatičko ispitivanje (s obnavljanjem)** ispitivanje je tijekom kojeg se ispitna otopina zamjenjuje periodički, u određenim razmacima.

**Statičko ispitivanje** ispitna je metoda u kojoj se ispitna otopina ne obnavlja tijekom ispitivanja.

**Ispitivana kemikalija je bilo koja tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.**

**Krajnja točka ispitivanja** opći je faktor koji se mijenja u odnosu na kontrolu zbog djelovanja ispitivane kemikalije u skladu s ciljem ispitivanja. U ovoj ispitnoj metodi krajnja je točka ispitivanja inhibicija rasta, koja se može izraziti različitim varijablama odgovora koje se temelje na jednoj mjernoj varijabli ili više njih.

**Ispitni medij** cjelokupni je sintetički uzgojni medij u kojem biljke koje se upotrebljavaju za ispitivanje rastu tijekom izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Ispitivana je kemikalija obično otopljena u ispitnom mediju.

**UVCB** je tvar nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvod ili biološki materijal.

**Prirast** je vrijednost mjerne varijable kojom se izražava biomasa na kraju razdoblja izlaganja umanjena za vrijednost mjerne varijable na početku razdoblja izlaganja. Napomena: kada je rast neizloženih organizama eksponencijalan, varijable odgovora koje se temelje na prirastu smanjivat će se tijekom ispitivanja.”